

Université de Montréal

Approche génomique pour l'étude de la polydactylie dépendante de *Hoxa11*

Par Mariane C.Fugulin

Programme de Biologie moléculaire
Faculté de médecine

Mémoire présenté
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès sciences (M. Sc.)
En Biologie moléculaire

Novembre, 2018

© Mariane C.Fugulin, 2018

Résumé

Le développement du membre nécessite les fonctions des complexes *HoxA* et *HoxD*. Les domaines d'expression des gènes *Hoxa11* et *Hoxa13* sont mutuellement exclusifs, avec l'expression de *Hoxa11* restreinte à la partie proximale et de *Hoxa13* restreinte à la partie distale. Il a été préalablement démontré que l'expression ectopique de *Hoxa11* au niveau de l'autopode induit le développement d'un membre polydactyle, tandis que nous avons démontré que la combinaison de la mutation perte-de-fonction *Gli3* (lignée *Xt/Xt*) avec cette mutation gain-de-fonction *Hoxa11* (lignée *Prx1Cre; Rosa26^{Hoxa11/Hoxa11}*) induit le développement d'un membre oligodactyle, avec la formation de moins de 5 doigts. L'objectif de ce projet était de caractériser l'effet de l'expression ectopique du facteur de transcription HOXA11 dans la modulation du nombre de doigts. Nous avons ainsi démontré par hybridation *in situ* que les mutants homozygotes *Xt/Xt; Prx1Cre; Rosa26^{Hoxa11/Hoxa11}* présente une diminution, voir une perte de l'expression du gène *Grem1* dans ces bourgeons de membre, ce qui conduirait à une altération de la boucle de rétrocontrôle SHH – GREM1 – FGFs. De plus, nous avons utilisé des approches génomiques d'immunoprécipitation de la chromatine suivi d'un séquençage à haut débit (ChIP-Seq) pour le facteur HOXA11 et la marque de modification épigénétique des histones, H3K27Ac, afin de caractériser l'effet de HOXA11 distal dans ces bourgeons de membre. L'ensemble des données nous a permis de mettre en évidence que HOXA11 participe à la régulation de l'expression de *Grem1*, mais aussi de certains gènes propres à la partie antérieure de l'autopode tel que *Alx4*, *Irx3/5* et *Hand1*.

Mots-clés : Développement du membre, Gènes *Hox*, Régions cis-régulatrices, Oligodactylie, Polydactylie, Régulation transcriptionnelle, *Grem1*

Abstract

Limb development requires *HoxA* and *HoxD* complexes genes, the expression domain of *Hoxa11* and *Hoxa13* are mutually exclusive, with *Hoxa11* being restricted to the proximal part of the limb bud, and *Hoxa13* being restricted to the distal part. It has been shown that ectopic expression of *Hoxa11* in the autopod domain induces a limb with polydactyly, but we have found that the combined *Gli3* loss-of-function (*Xt/Xt*) with *Hoxa11* gain-of-function (*Prx1Cre; Rosa26^{Hoxa11/Hoxa11}*) induces the development of an oligodactyl limb, with less than 5 digits formed. The aim of this project was to characterize the effect of the ectopic expression of HOXA11 transcription factor in the modulation of the digit number. We show by *in situ* hybridization that *Grem1* expression in the limb bud with ectopic *Hoxa11* and inactivated *Gli3* is reduced or lost, which leads to an alteration of the SHH – GREM1 – FGFs positive feedback loop. In addition, we have used genomic approaches (ChIP-Seq) for the HOXA11 transcription factor and the epigenetic mark H3K27Ac to characterize the effects of distal expression of *Hoxa11* genome-wide. We provide evidence that HOXA11 contributes to the regulation of *Grem1* expression, but also to the regulation of other anterior genes like *Alx4*, *Irx3/5* and *Hand1*.

Keywords: Limb development, *Hox* genes, Enhancer, Oligodactyly, Polydactyly, Transcriptional regulation, *Grem1*

Table des matières

Résumé	II
Abstract	III
Table des matières	IV
Liste des tableaux	VII
Liste des figures	VIII
Liste des abréviations	IX
Remerciements	XII
Chapitre 1 : Introduction	2
1.1 La famille des gènes <i>Hox</i>	2
1.1.1 Généralités	2
1.1.2 Colinéarité spatio-temporelle des gènes <i>Hox</i>	3
1.2 Le développement des membres	4
1.2.1 Généralités	4
1.2.2 Initiation de la formation du bourgeon de membre	6
1.2.2.1 Les gènes de la famille <i>Hox</i>	6
1.2.2.2 La nécessité de l'acide rétinoïque	6
1.2.2.3 La signalisation Wnt	7
1.2.2.4 Les gènes de la famille <i>Tbx</i>	8
1.2.2.5 La boucle de rétrocontrôle positive de la signalisation Fgf	9
1.2.3 Le rôle des gènes <i>Hox</i> lors de la structuration des différents segments du membre	11
1.3 Le développement du membre selon l'axe A-P	14
1.3.1 Caractérisation moléculaire de la ZPA, centre organisateur de l'axe A-P	14
1.3.2 Établissement de la ZPA et signalisation Shh	15
1.3.3 Le modèle du « gradient spatio-temporel »	16
1.3.4 Spécification A-P dépendante de <i>Gli3</i>	17
1.4 La croissance du bourgeon de membre	19
1.4.1 Boucle de rétrocontrôle positive Shh – GREM1 – FGFs	19
1.4.2 La régulation de l'expression de <i>Grem1</i>	21

1.4.3 Terminaison de la boucle SHH – GREM1 – FGFs	23
1.4.4 Spécification de l'identité des doigts	24
1.5 De la polydactylie à l'oligodactylie	26
1.5.1 <i>Gli3</i> et la polydactylie du mutant « Extra-toe »	26
1.5.2 Les gènes <i>Hox</i> et la polydactylie	27
1.5.3 La polydactylie des mutants <i>Gli3</i> ; 5' <i>Hox</i> et le mécanisme de type Turing	27
1.5.4 La polydactylie du mutant RA11KI	29
1.6 Projet de recherche	31
1.6.1 Hypothèse	31
1.6.2 Objectifs	31
Chapitre 2 : Matériel et méthodes	33
2.1 Lignée de souris	34
2.2 Synthèse des sondes ARNs	35
2.3 Hybridation <i>in situ</i>	35
2.4 ChIP-Seq	36
2.5 Analyse bio-informatique avec la plateforme en ligne Galaxy	37
2.6 Analyse bio-informatique avec la plateforme interactive EaSeq	38
2.7 Approbation de l'étude	38
Chapitre 3 : Résultats	39
3.1 Contribution des auteurs	40
3.2 Les bourgeons de membres mutants X^t; RA11KI présentent une variation du domaine d'expression de <i>Grem1</i>	41
3.3 Analyse bio-informatique des données brut du ChIP-Seq H3K27Ac via les plateformes Galaxy et EaSeq	44
3.3.1 Analyse du contrôle de la qualité	46
3.3.2 Alignement des séquences et appel des pics	48
3.3.3 Annotation, corrélation et co-localisation	51
3.4 <i>Hoxa11</i> exprimé dans la région distale semble contrôler l'expression de <i>Grem1</i> dans les bourgeons de membre de souris	54
3.5 L'oligodactylie du triple mutant X^t; RA11KI est associée à une exacerbation de la perte de l'identité antérieure observée chez le mutant RA11KI	57

Chapitre 4 : Discussion	62
4.1 Le développement d'un membre oligodactyle	63
4.2 La régulation de <i>Grem1</i> par <i>Hoxa11</i> dans un contexte gain-de-fonction	64
4.3 Activation et répression médiée par HOXA11	65
4.4 L'expression distale de <i>Hoxa11</i> conduit à une perte de l'identité antérieure	67
4.5 Conclusions et perspectives	69
Bibliographie	71

Liste des tableaux

Tableau I : Amorces utilisées pour le génotypage des lignées de souris	34
---	-----------

Liste des figures

Figure 1.1. Conservation de l'organisation en complexe des gènes <i>Hox</i> et de leur motif d'expression chez la drosophile et la souris	3
Figure 1.2. Développement et structuration du membre chez la souris	5
Figure 1.3. Les mécanismes moléculaires de l'initiation de la formation du bourgeon de membre	10
Figure 1.4. Phénotypes des différents mutants <i>Hox</i> affectant le membre antérieur	13
Figure 1.5. Développement antéro-postérieur du bourgeon de membre antérieur	16
Figure 1.6. Établissement, propagation et terminaison de la boucle de rétrocontrôle positive SHH – GREM1 – FGFs	24
Figure 1.7. Phénotype opposé de l'expression distale de <i>Hoxa11</i> en présence ou en absence de <i>Gli3</i>	30
Figure 2.1 Génération de la lignée de souris RA11KI	35
Figure 3.1. Les bourgeons de membres de souris mutants Xt; RA11KI présentent un phénotype variable	42
Figure 3.2. Modification du domaine d'expression de <i>Grem1</i>	44
Figure 3.3. Analyse de la qualité des échantillons en provenance de l'expérience de ChIP-Seq effectué pour la marque de modification épigénétique H3K27Ac	47
Figure 3.4. Alignement et déduplication des échantillons	50
Figure 3.5. Analyses effectuées avec la plateforme interactive EaSeq	53
Figure 3.6. La liaison du facteur de transcription HOXA11 sur les éléments <i>cis</i> -régulateurs de <i>Grem1</i>	56
Figure 3.7. Le facteur de transcription HOXA11 semble réguler directement l'expression du gène <i>Alx4</i> dans un contexte gain-de-fonction	59
Figure 3.8. Les bourgeons de membres oligodactyles des mutants Xt; RA11KI présentent une perte de l'identité antérieure de l'autopode	61

Liste des abréviations

AER: « Apical Ectodermal Ridge », Crête apicale ectodermique

Alx4: Aristaless-like homéobox 4

A-P: Antéro-postérieur

AR : Acide rétinoïque

BAM: « Binary Alignment Map »

BED: « Browser Extensible Data »

BMP: « Bone morphogenetic protein »

FGF : « Fibroblast growth factor », Facteur de croissance des fibroblastes

Fmn1: Formin 1

Gli1/2/3: GLI-Kruppel family member 1/2/3

Grem1: Gremlin 1

Hand1/2: « Heart and Neural crest derivatives-expressed protein 2 »

Hox: Homéobox

Hox13: HoxA13/HoxD13

Irx3/5 : Iroquoïs Homéobox 3 et Iroquoïs Homéobox 5

Jag1 : « Jagged 1 »

Ld : « Limb deformity »

LEF1 : « Lymphoid Enhancer Binding Factor 1

Lhx9 : LIM Homéobox 9

LPM: « Lateral plate mesoderm », Plaque latérale mésodermique

Pax9: « Paired box 9 »

PFR: « Phalanx Forming Region », Région formant les phalanges

P-D: Proximo-distal

Ptch1 : « Patched 1 »

Raldh2: « Retinaldehyde dehydrogenase 2 », Déshydrogénase rétinale 2

RA11KI : Lignée de souris Prx1Cre; Rosa^{Hoxa11/Hoxa11}

RIME:

SALL-4: « Spalt Like Transcription Factor 4 »

SAM: « Sequence Alignment Map »

Shh: Sonic hedgehog

Smo: « Smoothed »

Sox9: « SRY box 9 »

TCF1: « T-cell factor 1 »

Tbx4/5: T-box 4/5

TSS: « Transcription Start Site »

WISH: « Whole-mount *In Situ* Hybridization », Hybridation *In Situ* sur embryons entiers

Wnt: « Wingless type MMTV integration site family

Xt: Lignée de souris Gli3^{XtJ/XtJ}, inactivation génétique de Gli3 chez la souris

Xt; RA11KI : Souris Xt/Xt; Prx1Cre; Rosa^{Hoxa11/Hoxa11}, issu du croisement entre les lignées de souris Xt/Xt et Prx1Cre; Rosa^{Hoxa11/Hoxa11}

ZPA: « Zone of polarizing activity », Zone d'activité polarisante

ZRS: « ZPA regulatory sequence », Séquence régulatrice du ZPA

À ma sœur,

Remerciements

Je voudrais d'abord remercier ma directrice de recherche, Dre Marie Kmita, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et m'avoir permis d'effectuer ce beau projet.

Je voudrais également remercier tous les membres du laboratoire et de l'institut, mais un merci tout particulier à Fanny, Annie et Juliette qui ont toujours été présentes pour me conseiller et me soutenir. Sans vous, cette expérience n'aurait pas été la même, merci!

Je voudrais finalement remercier mes parents Johane et Michael, ma conjointe Alie, mon frère Didier, ma sœur de cœur Audrey et mes amis, vous qui m'avez toujours soutenu et encouragé à poursuivre mes rêves et atteindre mes buts, merci!

Mariane C.F.

Chapitre 1 : Introduction

1.1 La famille des gènes *Hox*

1.1.1 Généralités

Les gènes homéotiques (*Hox*) codent pour des facteurs de transcription à homéodomaine qui possèdent un rôle essentiel pendant le développement embryonnaire. Initialement identifié chez la drosophile (*Drosophila melanogaster*), les protéines HOX modulent l'expression de gènes cibles le long de l'axe rostro-caudal (aussi appelé axe antéro-postérieur) permettant la spécification des différentes régions de l'organisme (Lewis, 1978). Ces gènes cibles contrôlent ensuite les événements morphogénétiques menant à la structuration de formes complexes (Goodman, 2003 ; Sheth, 2014). Chez toutes les espèces animales, les gènes *Hox* occupent donc une place stratégique au niveau des processus développementaux. L'étude moléculaire des différents gènes *Hox* a démontré que ces gènes possèdent tous une séquence commune de 180 paires de bases (pb) codant pour un homéodomaine. Ce domaine possède un motif de liaison à l'ADN de type hélice-tour-hélice, ce qui permet aux protéines HOX de lier l'ADN et ainsi remplir leur rôle de facteur de transcription (McGinnis, 1984 ; Gehring, 1994).

La drosophile ne possède que 8 gènes *Hox* réparti en un seul complexe, alors que les mammifères possèdent 39 gènes *Hox* divisés en quatre complexes : *HoxA*, *HoxB*, *HoxC* et *HoxD* (Figure 1.1). Chez la souris, ces quatre complexes possèdent entre 9 et 13 gènes *Hox* chacun et sont répartis sur quatre chromosomes différents, soit les chromosomes 6, 11, 15 et 2 respectivement (Duboule, 1989 ; Krumlauf, 1992 ; Veraksa, 2000 ; Goodman, 2003). La présence de quatre complexes chez les vertébrés émerge de deux événements de duplication successifs d'un gène retrouvé chez un ancêtre commun aux invertébrés (Lewis, 1978 ; Duboule, 1989). De plus, dans chaque complexe, les gènes *Hox* sont assignés à 13 groupes paralogues en se basant sur leur position au sein du groupe ainsi que sur la similarité de la séquence homéotique (Burke, 1995 ; Duboule, 1989 ; Krumlauf, 1992).

1.1.2 Colinéarité spatio-temporelle des gènes *Hox*

Lors du développement embryonnaire, les gènes *Hox* sont caractérisés non seulement par leur organisation en complexes, mais aussi par leur respect du principe de colinéarité spatio-temporelle pour leur expression. La colinéarité spatiale se traduit par la position relative de chaque gène *Hox* au sein des différents complexes et la position des segments dont il contrôle l'identité le long de l'axe antéro-postérieur pour le tronc et le long de l'axe proximo-distal lors du développement du membre. En effet, les gènes situés les plus en 3' du complexe sont exprimés dans les segments les plus antérieurs, alors que les gènes localisés plus en 5' du complexe, agissent au niveau des segments plus postérieurs (Duboule, 1989 ; Graham, 1989 ; Kessel, 1991). La colinéarité temporelle, quant à elle, consiste à l'activation successive et ordonnée des différents gènes au sein d'un même complexe. En effet, les gènes *Hox* du groupe 1, localisé en 3', sont activés en premier et avant les gènes *Hox* du groupe 2, qui sont activés avant les gènes *Hox* du groupe 3 et ainsi de suite, jusqu'à l'activation des derniers gènes des complexes, soit les gènes *Hox* du groupe 13 (Duboule, 1989 ; Kessel, 1991 ; Krumlauf, 1992 ; Burke, 1995).

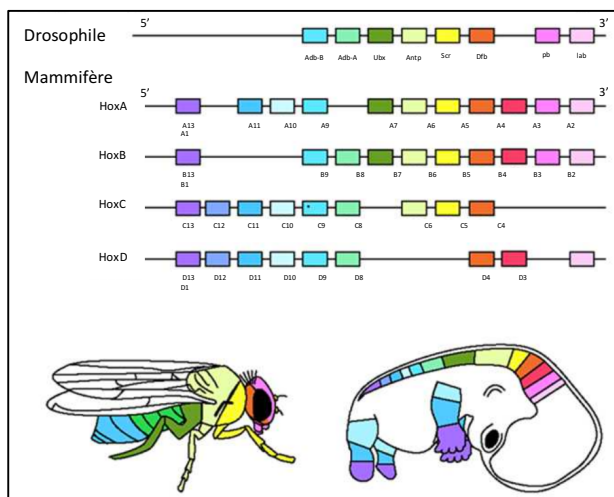


Figure 1.1 Conservation de l'organisation en complexes des gènes *Hox* et de leur motif d'expression chez la drosophile et la souris. La drosophile possède 8 gènes *Hox* répartis sur 1 seul complexe, tandis que les mammifères possèdent 39 gènes répartis sur 4 complexes. Le code couleur montre la correspondance entre l'ordre génomique des gènes *Hox* dans les complexes et la restriction spatio-temporelle de leur expression le long de l'axe rostro-caudal. Adapté de Goodman (2003).

1.2 Le développement des membres

1.2.1 Généralités

Le membre est un excellent modèle afin de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires qui contrôlent les processus développementaux de l'embryogenèse. Le membre est une structure complexe, organisée et facile d'accès, non seulement pour effectuer des expériences, mais aussi pour visualiser les conséquences phénotypiques qui en découlent. Les tétrapodes, qui font partie d'une super-classe d'animaux vertébrés regroupant les amphibiens et les amniotes (oiseaux, reptiles et mammifères), sont principalement caractérisés par leur squelette locomoteur, constitués de deux paires de membres chiroïdiens, soit les membres antérieurs et postérieurs. Chez la souris, le développement du membre antérieur commence au jour embryonnaire 9.5 (E9.5) et émerge de la plaque latérale mésodermique (LPM) au niveau du flanc de l'embryon. Ce bourgeon est une structure très organisée qui est constituée de cellules mésenchymateuses non-différenciées, recouverte d'une couche de cellules épithéliales constituant l'ectoderme (Bénazet, 2009 ; Zeller, 2009 ; Tickle, 2015).

Le bourgeon de membre qui émerge du flanc de l'embryon se développe selon 3 axes anatomiques distincts : l'axe proximo-distal (P-D), l'axe dorso-ventral (D-V) et l'axe antéro-postérieur (A-P) (Figure 1.2). L'axe P-D se situe de l'épaule aux bouts des doigts, l'axe D-V du dos de l'autopode vers la paume alors que l'axe A-P commence au doigt I, le pouce, et se termine au doigt V, l'auriculaire (Zuniga, 2015 ; Lopez-Rios, 2016). La croissance et le modelage squelettique de ce bourgeon de membre est coordonné par l'interaction concertée de deux centres signalétiques ou centres organisateurs. Ce premier centre signalétique est la crête apicale ectodermique (AER) qui contrôle le développement de l'axe P-D. L'AER se trouve être un ectoderme spécialisé, situé à l'extrémité distale du bourgeon de membre et produit plusieurs facteurs de croissance de la famille des FGFs (*Fibroblast Growth Factor*). Le second centre organisateur, la zone d'activité polarisante (ZPA), contrôle le développement le long de l'axe A-P, via un groupe de cellules (~150 cellules) localisées dans le mésenchyme postérieur du

bourgeon. La ZPA est constitué des cellules qui sécrètent le morphogène Sonic hedgehog (Zeller, 2009 ; Lopez-Rios, 2016).

Le membre en développement est composé de 3 segments le long de l'axe P-D. La structure la plus proximale, le stylopode, contient les cellules progénitrices de l'humérus. La structure intermédiaire, le zeugopode, formera les deux os de l'avant-bras : le radius et l'ulna. Finalement, le segment le plus distal, l'autopode conduit au développement des os des carpes, des métacarpes et des phalanges (Figure 1.2) (Lopez-Rios, 2016).

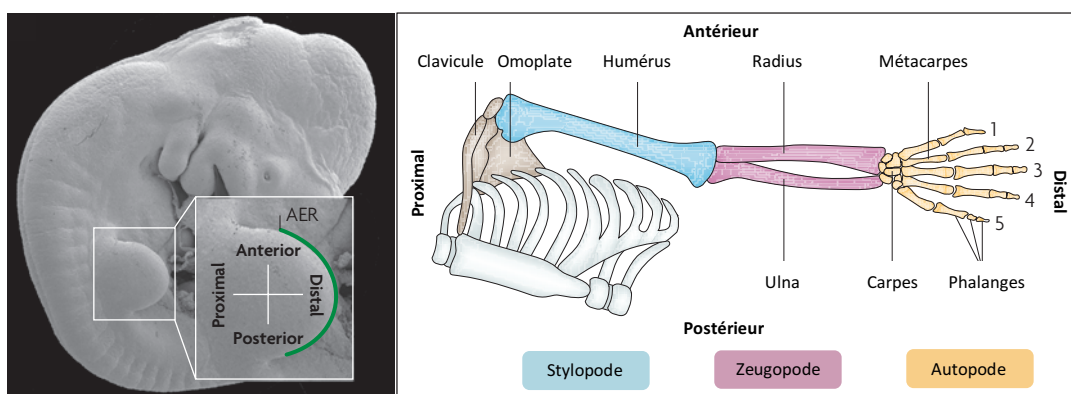


Figure 1.2 Développement et structuration du membre chez la souris. Photo d'un embryon au stade embryonnaire 10.5 (E10.5) obtenu par microscopie électronique à balayage. L'agrandissement du bourgeon de membre antérieur présente deux axes : l'axe antéro-postérieure et l'axe proximo-distal ainsi que la délimitation de la crête apicale ectodermique (AER) en vert (**image de gauche**). Schéma des différents éléments squelettique du bras. Le bras est composé de 3 segments : le stylopode correspondant à l'humérus, le zeugopode qui forme le radius (antérieur) et l'ulna (postérieur) et finalement, l'autopode composé des os des carpes, des métacarpes et des phalanges (**image de droite**). Adapté de Zeller et *al.* (2009)

1.2.2 Initiation de la formation du bourgeon de membre

1.2.2.1 Les gènes de la famille *Hox*

Les membres des vertébrés ne se développent pas n'importe où sur l'embryon. En effet, il existe de petites régions discrètes et spécifiques d'où le membre émerge le long de l'axe rostro-caudal. Ce sont des gènes de la famille *Hox*, du complexe *HoxC* particulièrement, qui jouent un rôle dans le positionnement des bourgeons de membres. Effectivement, il a été démontré que les gènes du complexe *HoxC* présentent un motif d'expression restreint à la LPM du flanc de l'embryon (Burke, 1995 ; Gaunt, 1994 ; Nowicki, 2000). *Hoxc4* et *Hoxc5* sont exprimés dans le mésenchyme du flanc de l'embryon, à l'endroit d'où va émerger le bourgeon de membre antérieur, correspondant aussi au niveau de la limite antérieur du domaine d'expression de *Hoxc6* (Gaunt, 1994 ; Burke, 1995 ; Nelson, 1996). L'expression des gènes *Hoxc6* et *Hoxc8* est restreinte au mésenchyme localisé entre les membres antérieurs et postérieurs. Tandis que ce sont les gènes *Hoxc9*, *Hoxc10* et *Hoxc11*, qui sont exprimés dans le mésenchyme de la LPM, qui positionnent le membre postérieur (Gaunt, 1994 ; Burke, 1995 ; Nelson, 1996). De plus, il a été démontré que la liaison de *Hoxc4* et de *Hoxc5* à un élément *cis*-régulateur localisé dans l'intron 2 du gène *Tbx5*, permet d'activer son expression au niveau du membre antérieur, tandis que la liaison des gènes *Hoxc9/10/11* à ce même élément, permet de bloquer l'expression de *Tbx5* au niveau du membre postérieur (Minguillon, 2012). L'expression des gènes de la famille *Hox* exprimés au niveau de la plaque latérale mésodermique serait donc la première étape, la plus précoce, qui permettrait d'activer la cascade génétique menant à la croissance du bourgeon de membre précoce.

1.2.2.2 La nécessité de l'acide rétinoïque

La zone d'où le membre émerge, est déjà spécifié d'un point de vue moléculaire au niveau du flanc de l'embryon. Il a été suggéré que l'acide rétinoïque (AR) serait le facteur axial de l'initiation du bourgeon de membre qui donnerait sa compétence à la LPM afin d'induire le développement du membre. Chez la souris, la synthèse de l'acide rétinoïque est accompli par l'enzyme déshydrogénase rétinale 2 (RALDH2) qui catalyse, de façon irréversible, la formation

de l'AR à partir du rétinol (aussi appelé rétinaldéhyde). Cette synthèse permet de générer un gradient d'acide rétinoïque le long de l'axe P-D lors de la croissance du bourgeon de membre (Mic, 2004 ; Lewandoski, 2009). En effet, il a été démontré que les souris pertes-de-fonctions pour l'enzyme RALDH2 ($Raldh2^{-/-}$) présentent plusieurs défauts morphologiques, dont un raccourcissement de la région postérieure de l'embryon et surtout, une perte de formation des bourgeons de membres (Niederreither, 1999 ; Nishimoto, 2015). De plus, les souris $Raldh2^{-/-}$ n'ont plus la capacité d'induire l'expression des marqueurs moléculaires spécifiques au développement précoce du bourgeon de membre et d'induire la formation de l'AER (Niederreither, 1999 ; Mic, 2004). Il est possible de rétablir l'expression de ces marqueurs en traitant la mère avec de l'AR au moment de l'établissement du territoire du futur bourgeon de membre, mais les embryons mutants présentent tout de même certains défauts morphologiques (Mic, 2004). D'un autre côté, il a aussi été démontré, lors d'expériences chez le poulet, que l'ajout d'inhibiteurs de Raldh2 empêche la formation du bourgeon de membre (Stratford, 1996), alors que l'incorporation d'une plaque d'aluminium entre les somites 15 à 20 et la LPM, bloque la formation d'un bourgeon de membre précoce (Stephens, 1981). Ces expériences chez la souris et le poulet démontrent bien l'importance de l'acide rétinoïque et de son enzyme de synthèse, Raldh2, lors de l'initiation du bourgeon de membre chez les vertébrés.

1.2.2.3 La voie de signalisation Wnt

Plusieurs équipes ont mis en évidence la contribution de la signalisation Wnt (Wingless type MMTV integration site family) lors de l'initiation du bourgeon de membre précoce, qui agirait en amont de *Fgf10* (Kawakami, 2001 ; Geetha-Loganathan, 2008 ; Nishimoto, 2015). Cependant, la contribution de cette signalisation n'a pas été déterminée puisqu'aucun ligand de la voie Wnt n'a été répertorié au niveau de la LPM et des tissus avoisinant (Nishimoto, 2015). Bien que Wnt2 est exprimé dans la LPM des futurs bourgeons de membres, son inactivation n'entraîne pas de défaut morphologique du développement des membres, suggérant une possible redondance fonctionnelle avec d'autres ligands Wnt (Monkley, 1996 ; Galceran, 1999). Par contre, des expériences chez le poulet ont démontré la présence de Wnt2b au niveau des somites et de la région présumée du bourgeon de membre antérieur ; et de Wnt8c au niveau de la région présumée du bourgeon de membre postérieur. Ces deux ligands permettent la transduction de la

signalisation Wnt via le complexe β -caténine/TCF, permettant de maintenir l'expression de FGF10 dans la LPM des bourgeons de membres (Kawakami, 2001 ; Geetha-Loganathan, 2008 ; Nishimoto, 2015). La signalisation Wnt agit aussi en amont du gène *Tbx5*, dans lequel un site de liaison TCF/LEF a été répertorié (Ng, 2002; Nishimoto, 2015). Les souris déficientes pour LEF1 et TCF1 (*Lef1*^{-/-}; *Tcf1*^{-/-}) présentent un bourgeon de membre de taille très réduite comparativement au type sauvage (Galceran, 1999). Néanmoins, ce phénotype semble être associé à une perte de la formation de la crête apicale ectodermique (AER) induisant un arrêt de la croissance, plutôt qu'à une perte de l'initiation de la formation du bourgeon de membre. En effet, il a été démontré que la signalisation Wnt est nécessaire à l'induction de l'expression de FGF10 et FGF8, tous deux nécessaires pour la formation de l'AER (Kengaku, 1998 ; Galceran, 1999 ; Nishimoto, 2015). Ces expériences effectuées chez la souris et le poulet permettent de démontrer l'importance de la signalisation Wnt pour l'initiation de la formation du bourgeon de membre précoce.

1.2.2.4 Les gènes de la famille *Tbx*

Les gènes de la famille *Tbx* codent pour des facteurs de transcription qui sont définis par une séquence de liaison à l'ADN hautement conservé, appelée la T-box (*Tbx*). Les gènes *Tbx4* et *Tbx5* sont essentiels lors de l'initiation de la formation du bourgeon de membre précoce chez les vertébrés, mais aussi pour la détermination identitaire des membres antérieurs et postérieurs. L'expression de ces deux gènes étant mutuellement exclusives, l'expression de *Tbx5* est restreinte à la LPM et au mésenchyme du membre antérieur alors que l'expression de *Tbx4* se situe dans la LPM et le mésenchyme du membre postérieur (Chapman, 1996 ; Gibson-Brown, 1996). Chez la souris, la délétion du facteur TBX5 conduit à la perte du développement du bourgeon de membre antérieur, alors que son expression ectopique à un autre endroit du flanc de l'embryon induit le développement anormal d'un bourgeon de membre précoce (Rodriguez-Esteban, 1999 ; Takeushi, 1999 ; Agarwal, 2003 ; Minguillon, 2005). Chez les embryons *Tbx4*^{-/-}, l'initiation du développement du membre semble normale, mais le membre ne parvient pas à se développer davantage (Takeushi, 1999 ; Minguillon, 2005). Il a été démontré que l'expression ectopique de *Tbx4* au niveau du membre antérieur cause une transformation partielle de l'aile-à-la-jambe, alors que la mauvaise expression de *Tbx5* dans le membre postérieur induit une

transformation partielle inverse (Rodriguez-Esteban, 1999 ; Takeushi, 1999). Ces résultats démontrent l'importance de ces facteurs pour la spécification identitaire des membres.

1.2.2.5 La boucle de rétrocontrôle positive de la signalisation FGFs

Finalement, l'initiation de la formation du bourgeon de membre implique l'établissement d'une boucle de rétrocontrôle épithélio-mésenchymateuse, entre FGF10 et FGF8, favorisant une croissance distale. Cette boucle de rétrocontrôle est caractérisée par l'induction première de FGF10 dans le mésenchyme du territoire du futur bourgeon de membre, suivi par l'induction de FGF8 au niveau de l'ectoderme apical (Ohuchi, 1997). *Fgf10* permet donc d'induire et de maintenir l'expression de *Fgf8* dans l'ectoderme de l'AER, alors que *Fgf8* régule positivement l'expression de *Fgf10* dans le mésenchyme sous-jacent (Ohuchi, 1997 ; Sekine, 1999). De plus, l'application de billes permettant une expression ectopique de FGF10 dans le flanc de l'embryon, permet d'induire l'expression de *Fgf8* dans l'ectoderme adjacent, conduisant à la formation complète d'un membre ectopique (Cohn, 1995 ; Ohuchi, 1997 ; Sekine, 1999). Il a d'ailleurs été démontré que la perte de FGF10 chez la souris (*Fgf10*^{-/-}) conduit à une troncation complète des membres antérieurs et postérieurs, avec le développement d'une omoplate et d'un os iliaque rudimentaire uniquement (Sekine, 1999). En effet, chez ses embryons, l'initiation de la formation du bourgeon de membre débute normalement, mais la croissance subséquente du bourgeon ne se produit pas. De plus, l'inactivation conditionnelle de FGF8 entraîne des défauts morphologiques importants tels que la perte de la formation du radius et du doigt I, démontrant l'importance des gènes *Fgf8* et *Fgf10* lors du développement des bourgeons de membres précoces (Moon, 2000). Finalement, ces étapes d'initiation de la formation du bourgeon de membre permettent la formation du premier centre signalétique identifié il y a plus de 70 ans, la crête apicale ectodermique (AER), qui spécifie la morphologie du membre le long de l'axe P-D (Saunders, 1948 ; Niswander, 1993 ; Ohuchi, 1997). L'AER se trouve être une fine couche d'ectoderme localisée à l'extrémité la plus distale du bourgeon de membre et il a été démontré que son retrait, par microchirurgie, conduit à une troncation du bourgeon de membre (Saunders, 1948).

Pour résumé, l'induction du bourgeon de membre antérieur est induite par l'activité de l'acide rétinoïque qui permet d'activer directement l'expression du facteur de transcription *Tbx5* au niveau de la LPM. L'activation de *Tbx5* par l'AR se fait en coopération avec les facteurs de transcription HOXC4/5 et la signalisation Wnt via β -caténine/TCF/LEF. Par la suite, l'initiation du bourgeon de membre se poursuit via l'activation de l'expression de *Fgf10* par TBX5 exprimé dans la LPM et par l'AR produite au niveau des somites. Finalement, *Fgf10* induit l'expression de *Fgf8* au niveau de l'ectoderme apical, qui à son tour, induit l'expression de *Fgf10* dans le mésenchyme sous-jacent, favorisant ainsi la croissance distale du bourgeon (Figure 1.3).

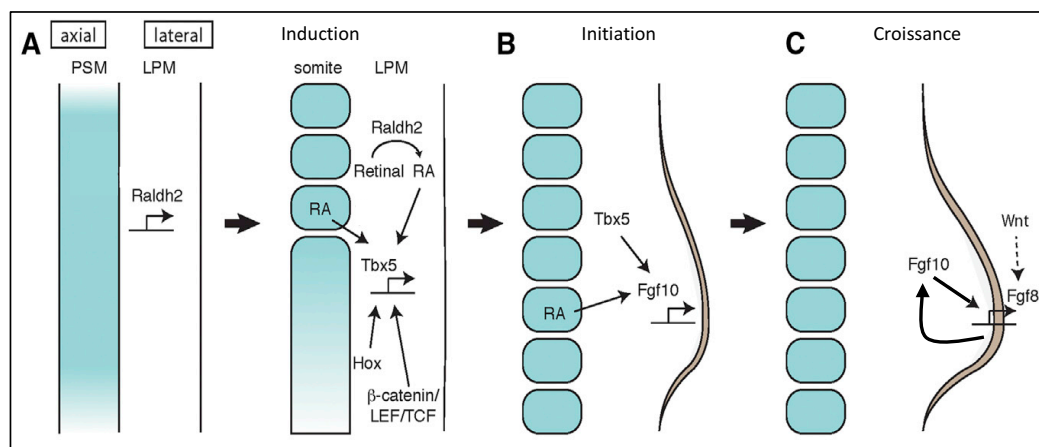


Figure 1.3 Les mécanismes moléculaires de l'initiation de la formation du bourgeon de membre. A) Lors de l'induction du bourgeon de membre, il y a activation de l'expression de *Raldh2* au niveau de la plaque latérale mésodermique (LPM) permettant ainsi l'induction de *Tbx5* dans la LPM par l'action coopérative de l'acide rétinoïque (AR), des gènes *Hox* et de la signalisation β -caténine/TCF/LEF. B) Par la suite, l'AR des somites agit en coopération avec *Tbx5* pour induire l'expression du facteur de croissance *Fgf10*. C) L'activation de *Fgf10* dans le mésenchyme du membre induit l'expression de *Fgf8* au niveau de l'ectoderme sus-jacent permettant d'établir une boucle de rétrocontrôle positive *Fgf10*-*Fgf8* qui est nécessaire pour la croissance distale du bourgeon de membre. Adapté de Nishimoto et *al.* (2015)

1.2.3 Le rôle des gènes *Hox* dans la spécification des différents segments du membre

Une fois que le bourgeon de membre initie sa formation, il est alors nécessaire que le membre se développe le long de l'axe proximo-distal (P-D) afin de permettre la formation des différentes structures le composant. Les gènes *Hox* des différents complexes sont essentiels non seulement pour la structuration squelettique le long de l'axe rostro-caudal, mais aussi lors du développement P-D des membres. Par contre, le développement des membres ne nécessite que les fonctions des complexes *HoxA* et *HoxD*, puisqu'il a été démontré que la délétion des complexes *HoxB* et *HoxC* n'engendre pas de phénotype anormal de la structuration osseuse du membre (Figure 1.4) (Medina-Martinez, 2000 ; Suemori, 2000 ; Kmita, 2005 ; Zakany, 2007a). De plus, le principe d'expression spatio-temporelle des gènes *Hox* observé lors de la structuration du tronc, est également retrouvé dans le processus de développement du membre (Nelson, 1996 ; Shubin, 1997). L'expression des gènes des complexes *HoxA* et *HoxD* dans le membre est dynamique et se produit en deux phases distinctes. Lors de la première phase, la phase précoce, les gènes *Hox* sont activés progressivement et présentent des domaines d'expression chevauchant le long de l'axe antéro-postérieure (A-P). Cette phase est aussi caractérisée par une restriction progressive des gènes localisés les plus en 5' des complexes dans la région postérieure. La deuxième phase, la phase tardive, se distingue de la phase précoce par l'expression différentielle des gènes *HoxA/D* des groupes paralogues 9 à 13, mais le long de l'axe P-D cette fois (Zakany, 2007a). La formation du stylopode et du zeugopode débute lors de la phase précoce, tandis que la phase tardive spécifie la morphologie de l'autopode (le poignet et les doigts).

Des mutations pertes-de-fonctions de certains gènes des complexes *HoxA* et *HoxD*, individuellement ou en combinaison, ont un impact très important sur le développement du membre, particulièrement pour les gènes des groupes paralogues 9 à 13. En effet, le simple mutant *Hoxa9* ne présente aucun défaut de morphologie du membre, tandis que le mutant *Hoxd9* présente un humérus de taille légèrement réduite avec une déformation de la crête deltoïde. Le double mutant *Hoxa9/Hoxd9* (*Hox9*), présente des défauts morphologiques plus drastiques que le simple mutant *Hoxd9*^{-/-}. La diminution de la taille de l'humérus le long de l'axe P-D, ainsi qu'une perte ou une forte altération de la crête deltoïde sont toujours présentes (Fromental-

Ramain, 1996). Ces expériences permettent de démontrer les fonctions spécifiques individuelles de chacun des membres du groupe paralogue, mais aussi de démontrer l'effet de redondance fonctionnelle des protéines HOXA9 et HOXD9 (Fromental-Ramain, 1996 ; Xu, 2011). Cependant, les gènes *Hox9* ne sont pas les seuls gènes impliqués dans la formation du stylopode, en fait, les gènes *Hoxa10* et *Hoxd10* (*Hox10*) sont aussi nécessaires pour le développement du bras (stylopode). La perte de fonction des gènes *Hox10* entraîne des défauts morphologiques du stylopode, avec une absence de la crête deltoïde et une réduction de la taille du stylopode le long de l'axe P-D (Favier, 1996 ; Wellik, 2003 ; Pineault, 2014). Ces résultats suggèrent donc que les gènes des groupes paralogues *Hox9* et *Hox10* coopèrent afin de structurer correctement le stylopode.

En ce qui concerne le zeugopode, ce sont les fonctions des groupes paralogues *11*, *Hoxa11* et *Hoxd11*, qui sont nécessaires à son bon développement (Favier, 1996 ; Wellik, 2003 ; Boulet, 2003 ; Pineault, 2014). Chez la souris, la perte de *Hoxa11* entraîne une réduction de la taille du zeugopode, ainsi qu'une courbure des os le composant, le radius et l'ulna, et une fusion des différents os constituant le poignet (Small, 1993 ; Davis, 1995 ; Boulet, 2003). L'inactivation génétique de *Hoxd11* induit aussi une réduction de la taille du zeugopode, ainsi que certains défauts de structuration affectant le poignet et la région distale de l'avant-bras (Davis, 1995 ; Favier, 1996 ; Boulet, 2003). La perte combinée des facteurs *Hox11* induit de sévères malformations au niveau du zeugopode, où ce dernier est fortement réduit ainsi que des fusions des différents os des carpes et des métacarpes (Figure 1.4) (Davis, 1995; Wellik, 2003; Boulet, 2003). Ces résultats permettent de démontrer une fois de plus, la fonction redondante des différents gènes du groupe paralogue, mais aussi que les fonctions des gènes *Hoxa11* et *Hoxd11* sont nécessaires pour le développement du zeugopode.

L'inactivation génétique complète des groupes paralogues *13* (*Hoxa13* et *Hoxd13*) se traduit par la perte complète de l'autopode (Figure 1.4) (Fromental-Ramain, 1996). De plus, la perte de ces gènes chez la souris, induit une activation ectopique des gènes *Hox* de la phase précoce dans le domaine distal, domaine de la spécification des doigts (Sheth, 2012, 2016). Des mutations perte-de-fonction pour le gène *Hoxa13* de façon spécifique dans le bourgeon de membre, entraîne la perte du doigt le plus antérieur, le doigt I (le pouce), ainsi qu'à une réduction de la taille des

différents doigts formés (Fromental-Ramain, 1996). L'inactivation génétique du gène *Hoxd13* affecte davantage la région postérieure de l'autopode que la région antérieure, avec une réduction en taille de certains doigts, une perte de certaines phalanges, une fusion de certains os des carpes (Dollé, 1993).

Finalement, la délétion des complexes *HoxA* et *HoxD* induit un arrêt du développement du bourgeon de membre, avec seulement la partie la plus proximale du stylopode qui se développe (Figure 1.4) (Kmita, 2005). Ainsi, les différentes expériences de perte-de-fonction des différents gènes *Hox* ont démontré l'importance de leur fonction lors de la structuration P-D du bourgeon de membre. De plus, ces expériences ont permis de démontrer le rôle spécifique de chacun des gènes impliqués, mais aussi de conforter le mécanisme de redondance fonctionnelle de ces facteurs lors de l'installation de l'identité segmentaire du membre en formation.

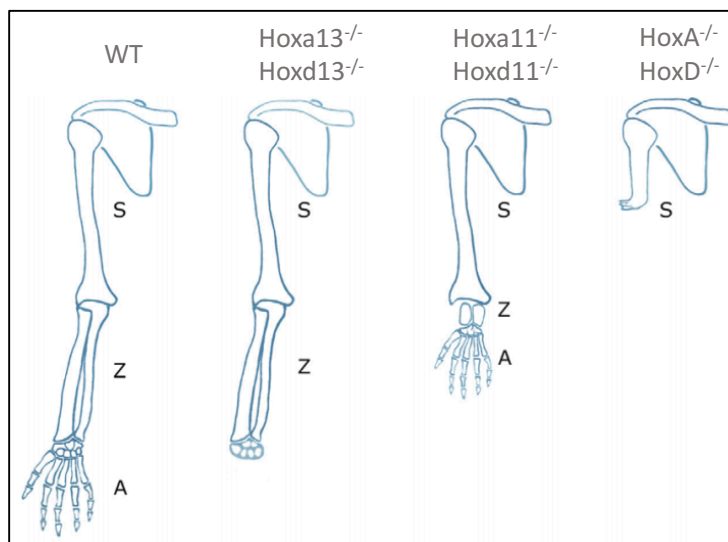


Figure 1.4 Phénotypes des différents mutants *Hox* affectant le membre antérieur. En absence des gènes *Hoxa13* et *Hoxd13*, le développement du stylopode et du zeugopode se produit normalement, mais l'autopode est complètement dépourvu de doigts. L'absence des gènes *Hoxa11* et *Hoxd11* induit le développement d'un zeugopode de taille très réduite, tandis que le stylopode et l'autopode se développent normalement. Finalement, la perte complète des complexes *HoxA* et *HoxD* conduit à un arrêt précoce du développement du membre antérieur conduisant au développement du tiers le plus proximal du stylopode. Adapté de Zakany et al. (2007a)

1.3 Le développement du membre selon l'axe A-P

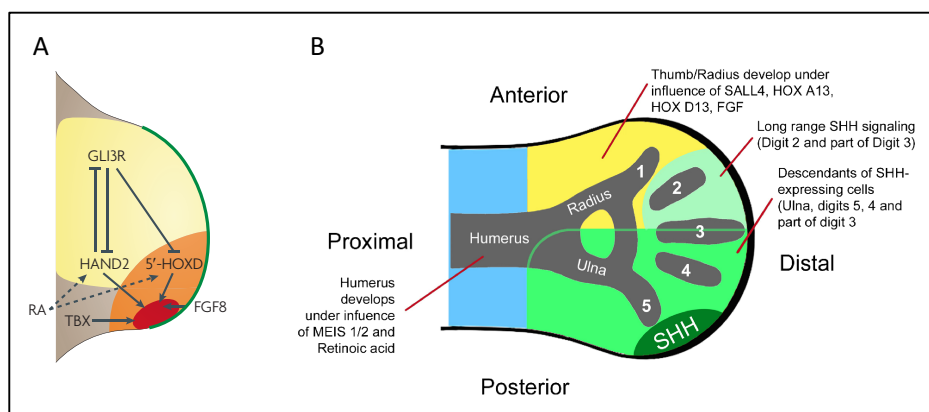
1.3.1 Caractérisation moléculaire de la ZPA, centre organisateur de l'axe A-P

Le deuxième centre organisateur du bourgeon de membre spécifie la morphologie du membre le long de l'axe antéro-postérieur (A-P). Ce centre a été découvert grâce à des expériences classiques de greffes de tissus chez le poulet. La greffe d'une section d'environ 150 cellules du mésenchyme de la région postérieure en provenance d'un membre donneur, sur un membre receveur du côté antérieur du bourgeon de membre, induit une duplication des doigts en image miroir. Ce phénotype est accompagné d'un AER allongé et une augmentation de la division cellulaire dans la région antérieure, induisant une perte de l'identité antérieure des doigts (Saunders, 1948, 1968 ; Tickle, 1981). Ce centre organisateur du bourgeon de membre est nommé ZPA pour « Zone d'activité polarisante » et se trouve être défini par son aptitude polarisante permettant d'instruire le destin des cellules composant le mésenchyme le long de l'axe A-P. La découverte de ce centre organisateur a permis d'émettre l'hypothèse que ce centre sécrèterait un morphogène qui spécifierait l'identité des cellules du mésenchyme le long de son gradient, suivant l'axe A-P (Wolpert, 1969). Ce n'est que plus de 20 ans plus tard que le morphogène sécrété par la ZPA a finalement été identifié; Sonic Hedgehog (SHH). En effet, la greffe dans la région antérieure de fibroblastes exprimant SHH, induit une duplication en image miroir des doigts, tout comme la greffe des cellules de la ZPA (Riddle, 1993). De plus, chez la souris, l'inactivation génétique de *Shh* conduit à la perte des structures de l'identité postérieure, soit les doigts II à V et l'ulna (Chiang, 2001 ; Kraus, 2001). Ce résultat démontre non seulement l'importance de cette molécule pour le développement du membre, mais aussi que les structures spécifiques à l'identité antérieure, le doigt I et le radius, se développent de façon indépendante à la signalisation SHH. Le développement du doigt I, quant à lui, nécessite la fonction des facteurs de transcription TBX5, HOX13 et SALL-4 (Fromental-Ramain, 1996 ; Koshiba-Takeushi, 2006 ; Montavon, 2008).

1.3.2 Établissement de la ZPA et signalisation *Shh*

Dans la région postérieure, l'expression de *Shh* est régulée par un élément cis-régulateur, la ZRS (« ZPA Regulatory Sequence »), localisé dans le gène *Lmbr1*, à environ 800 kb en amont du gène *Shh* (Lettice, 2002 ; Lettice, 2003 ; Williamson, 2016). En effet, la construction d'un transgène ayant un gène rapporteur LacZ sous contrôle de l'élément régulateur ZRS, permet de récapituler la majorité des aspects de l'expression de *Shh* dans les bourgeons de membres (Lettice, 2003). Il a été démontré qu'une mutation dans cet élément cis-régulateur induit l'expression de *Shh* dans la région antérieure de l'autopode, causant un phénotype de polydactylie, alors que la délétion de cet élément induit la perte complète de l'expression de *Shh* (Maas, 2005 ; Masuya, 2007). De façon intéressante, il a également été montré que les facteurs de transcription HAND2 et HOXD13 font partie d'un complexe protéique qui se lie de façon directe au ZRS, contrôlant l'activation de l'expression de *Shh* dans les bourgeons de membres (Capellini, 2006 ; Galli, 2010). De plus, les mutations pertes-de-fonctions pour le gène *Hand2* ou les gènes 5'*Hox* présentent aussi une perte de l'expression de *Shh* (Tarchini, 2006 ; Galli, 2010). L'activité du facteur de transcription GLI3 (GLI-Kuppel Family Member 3) sous sa forme répressive (GLI3R) dans la partie antérieure de l'autopode médie la restriction postérieure de l'expression des gènes *Hand2* et 5'*Hox* (Figure 1.5A). L'antagonisme mutuel de *Gli3* et *Hand2* permet donc d'induire un pré-plan d'organisation du bourgeon de membre en croissance (te Welscher, 2002). De plus, GLI3 est un médiateur de la signalisation SHH et il a été prouvé qu'il participe aussi à la régulation de l'expression de *Shh* en réprimant son expression dans les cellules de la région antérieure de l'autopode. De ce fait, un gradient SHH est généré avec une plus forte concentration de cellules l'exprimant dans la région postérieure du bourgeon de membre (Büscher, 1997 ; Wang, 2000; te Welscher, 2002). Finalement, le cholestérol permet aussi de modifier SHH du côté C-terminal de la protéine, cette modification permet de restreindre la signalisation longue-distance de SHH. En effet, les protéines SHH qui ne possèdent pas cette modification sont plus diffuses, induisant une duplication des doigts à identité antérieur (Li, 2006).

L'identité des différents doigts composants la main est influencée par la signalisation *Shh*. D'élégantes expériences de suivi de lignées cellulaires, exprimant *Shh* ou y répondant, a permis d'identifier l'influence de la signalisation *Shh* vis-à-vis de l'identité des différents doigts (Ahn, 2004 ; Harfe, 2004). Ces expériences ont permis de formuler le modèle du « gradient spatio-temporel » stipulant que l'identité des doigts qui composent l'autopode est déterminée en fonction du temps et de la concentration d'exposition à la signalisation *Shh* (Figure 1.5B) (Ahn, 2004 ; Harfe, 2004). Spécifiquement, l'identité des doigts IV et V, l'auriculaire et l'annulaire, sont composés des cellules de la ZPA ou ses descendants (ces cellules ont exprimé *Shh*, permettant ainsi une signalisation autocrine de *Shh* sur ces cellules). Le doigt III, le majeur, est composé de cellules ayant exprimés le morphogène SHH, mais aussi de cellules qui ne l'ont pas exprimé, ce doigt est donc constitué de cellules qui ont été exposées à une signalisation autocrine et à une signalisation paracrine de la signalisation SHH. Le doigt II, l'index, est constitué de cellules exposées uniquement à la signalisation longue-distance de SHH, alors que le doigt I, le pouce, se développe de façon indépendante à cette signalisation (Ahn, 2004 ; Harfe, 2004 ; Scherz, 2007).



16

l'autopode. B) Le zeugopode et l'autopode peuvent être divisé en 3 zones en fonction de la signalisation Shh. Les descendants de *Shh* sont responsables du développement de l'ulna, des doigts IV et V et une partie du doigt III. La signalisation longue-distance de *Shh* participe au développement du doigt II et d'une partie du doigt III. Le doigt I et le radius se développent de façon indépendante à la signalisation *Shh*, ils nécessitent plutôt l'influence de gènes tels que *Hoxa13*, *Sall4* et *Fgf8*. A. De Zeller et al. (2009) et B. De Al-Qattan (2013).

1.3.4 Spécification A-P dépendante de *Gli3*

Shh n'étant pas activé lors des douze premières heures du développement du membre, la polarité du bourgeon de membre le long de l'axe A-P débute avant son activation (Yang, 1997). En effet, la croissance du bourgeon de membre nécessite l'établissement d'un pré-plan d'organisation qui sera en place au moment de l'activation de *Shh* et de sa signalisation. Lorsque le bourgeon de membre émerge de la LPM, l'expression des gènes 5'*Hox* est restreinte à la partie postérieure de l'autopode (Izpisua-Belmonte, 1992 ; Dollé, 1993 ; Tarchini, 2006). Le facteur de transcription *Hand2* est aussi exprimé dans un premier temps dans la LPM et son expression est ensuite restreinte à la région postérieure du bourgeon de membre (de Welscher, 2002). Cette restriction antérieure des facteurs de transcription 5'*Hox* et *Hand2* est médiée par *Gli3*, facteur de transcription restreint à la région antérieure de l'autopode, par une opposition mutuelle avec HAND2. L'antagonisme mutuel présent entre ces deux facteurs permet ainsi d'installer un pré-plan d'organisation de la polarité le long de l'axe A-P, favorisant une activation subséquente de *Shh*, restreinte à la région postérieure du bourgeon de membre (Figure 1.5A).

Le facteur de transcription GLI3 possède une activité bi-fonctionnelle, lui conférant la capacité de se retrouver sous deux formes distinctes dans un bourgeon de membre; une forme répressive (GLI3R) dans la région antérieure, et une forme activatrice (GLI3A) dans la région postérieure de l'autopode (Dai, 1999 ; Wang, 2000). En effet, dans la partie antérieure, en absence de SHH, la protéine GLI3 subi rapidement un clivage protéolytique et se retrouve sous sa forme possédant une activité répressive (GLI3R), tandis que dans la partie postérieure, la présence de SHH permet de bloquer ce clivage, et ainsi de conserver GLI3 sous sa forme longue et activatrice (GLI3A) (Wang, 2000 ; Ahn, 2004 ; Bowers, 2012). GLI3 sous sa forme répressive permet de

restreindre la signalisation *Shh* à la région postérieure du bourgeon de membre. En effet, l'inactivation génétique de *Gli3* induit un phénotype de polydactylie préaxiale avec la formation de plus de cinq doigts, qui est caractérisée par une expression ectopique de *Shh* dans la région antérieure de l'autopode (Wang, 2000). Le même phénotype de polydactylie préaxiale étant observé chez le double mutant *Gli3*^{-/-}; *Shh*^{-/-}, suggère qu'une des fonctions de SHH semble être contrecarrée par la fonction de GLI3R afin de permettre l'organogenèse des membres (Litington, 2002). Ce résultat suggère aussi que la polydactylie préaxiale du mutant *Gli3* est indépendante de la signalisation *Shh*.

La spécification des progéniteurs antérieurs est dépendante de *Gli3* et une activation précoce de *Shh* interfère avec ce processus en bloquant l'expansion de ces progéniteurs. Cependant, *Gli3* n'est pas le seul gène nécessaire à la spécification des progéniteurs antérieurs chez la souris. Il a été montré que l'inactivation des facteurs de transcription *Iroquois homéobox 3* et *Iroquois homéobox 5* (*Irx3/5*) induit des défauts de structuration de certains éléments osseux spécifiques à la région proximo-antérieure de l'autopode (Li, 2014). Par contre, la diminution de la signalisation *Shh* dans les bourgeons de membre des souris double mutantes *Irx3*^{-/-}; *Irx5*^{-/-} permet de restaurer la morphologie de ces structures osseuses, suggérant une régulation négative de leur formation par *Shh* (Li, 2014 ; Zhulyn, 2014). Par conséquent, il est nécessaire que l'activation de *Shh* soit contrôlée de façon spatio-temporelle afin de permettre la spécification et l'expansion des progéniteurs antérieurs (Zhulyn, 2014 ; Li, 2014).

La signalisation *Shh* induit l'activation transcriptionnelle de ses gènes cibles dans le bourgeon de membre postérieur, tel que l'un de ses récepteurs, *Patched 1* (*Ptch1*) et le régulateur transcriptionnel *Gli1* (*GLI-Kuppel Family Member 1*). Suite à sa sécrétion, la protéine SHH lie et inactive son récepteur PTCH1, qui normalement inhibe l'activité de la protéine transmembranaire SMOOTHENED (SMO) permettant la transduction de la signalisation *Shh* (Yang, 1997 ; Murone, 1999). De façon intéressante, il a été démontré que l'altération d'un élément *cis*-régulateur de *Ptch1* entraîne le phénotype d'oligodactylie observé chez les bovins (Lopez-Rios, 2014). L'inactivation de *Ptch1* chez la souris induit une altération de la régulation de la signalisation *Shh* qui se traduit par un phénotype d'oligodactylie très semblable à l'autopode des bovins, avec deux condensations latérales réduites et deux primordia centraux

(Lopez-Rios, 2014). De plus, il a été prouvé que l'inactivation de *Ptch1* dans un bourgeon de membre précoce induit une augmentation de la signalisation SHH dans tout le membre, qui engendre un phénotype d'oligodactylie (Logan, 2002 ; Butterfield, 2009). Ce phénotype d'oligodactylie, la formation de moins de cinq doigts, semble résulter d'une perte d'interaction entre la ZPA du mésenchyme et l'AER de l'ectoderme distal et donc d'une perte d'asymétrie le long de l'axe A-P (Butterfield, 2009). Ainsi, la présence de SHH permet d'inhiber l'activité de PTCH1 sur SMO, résultant en la localisation nucléaire des facteurs de transcription GLI, effecteurs terminaux de la signalisation *Shh* (Murone, 1999 ; Sasaki, 1999).

1.4 Croissance du bourgeon de membre

Plusieurs expériences chez le poulet ont montré que l'AER/FGFs et la ZPA/SHH sont liées par leur signalisation moléculaire, favorisant le contrôle de la croissance du bourgeon de membre. En effet, il a été prouvé que l'AER maintient la ZPA et inversement, la ZPA maintient l'AER (Niswander, 1994 ; Laufer, 1994). Ce contrôle du développement du bourgeon permet de relier la mise en place de la polarité A-P avec le développement le long de l'axe P-D. Ce lien qui unit les axes A-P et P-D permet d'établir le plan d'organisation de l'autopode et la croissance du bourgeon de membre, qui nécessite l'établissement d'une boucle de rétrocontrôle positive entre le mésenchyme du bourgeon et l'ectoderme distal formé par l'AER (Bénazet, 2009a).

1.4.1 La boucle de rétrocontrôle positive SHH – GREM1 – FGFs

La base moléculaire de l'interaction entre les deux centres signalétiques qui contrôlent le développement du bourgeon de membre a été mise en évidence suite à la découverte que l'incorporation de billes imprégnées de FGFs permet le maintien de l'expression de *Shh* et la croissance du bourgeon suite au retrait de l'AER (Niswander, 1994 ; Laufer, 1994). Cependant, il est essentiel de contrôler le niveau des BMPs dans le bourgeon de membre afin d'instaurer cette communication entre la ZPA et l'AER. En effet, plusieurs membres de la famille des « Bones Morphogenetic Proteins » (BMPs) sont exprimés de façon dynamique par l'AER et dans le mésenchyme du bourgeon de membre; principalement les protéines BMP2, BMP4 et BMP7 (Duprez, 1996 ; Bandyopadhyay, 2006). Toutefois, une augmentation de la signalisation

Bmp dans un bourgeon bloque l'expansion antérieure des *Fgfs* de l'AER et induit un processus de mort cellulaire au niveau du mésenchyme (Pizette, 1999 ; Bénazet, 2009). De plus, il a été démontré que l'activité des BMPs du bourgeon de membre a un effet négatif sur la boucle de rétrocontrôle existant entre la ZPA et l'AER; la suppression de l'activité endogène des BMPs permet de prolonger et renforcer l'activité de l'AER, tandis qu'une signalisation persistante des BMPs induit une expansion de la signalisation AER/FGFs et un phénotype de polydactylie (Niswander, 1993 ; Pizette, 1999 ; Selever, 2004 ; Bénazet, 2009). Il a alors été proposé qu'un antagoniste endogène des BMPs possède un tel rôle chez les vertébrés, puisque plusieurs de ces protéines sont présentes dans les bourgeons de membre tel que NOGGIN, DAN et GREMLIN (Brunet, 1998 ; Pearce, 1999 ; Merino, 1999). Cependant, la perte de *dan* ou de *noggin* n'affecte pas la croissance précoce du bourgeon de membre, ni son architecture (Brunet, 1998 ; Dionne, 2001).

Chez la souris, des mutations de l'allèle *limb deformity (ld)* induisent des défauts de l'AER causés par une interruption de la boucle de rétrocontrôle SHH – FGFs. En fait, ces mutations de l'allèle *ld* affectent des éléments *cis*-régulateurs contrôlant l'expression d'un antagoniste des BMPs, nommé *Gremlin 1* (Haramis, 1995 ; Khokha, 2003 ; Zuniga, 2004 ; Michos, 2004). *Gremlin 1*, membre de la famille DAN, antagoniste des BMPs, est largement exprimé dans le mésenchyme du bourgeon de membre et il a été démontré que c'est la molécule sécrétée permettant la transduction du signal entre la ZPA du mésenchyme et l'AER postérieur de l'épithélium (Zuniga, 1999 ; Khokha, 2003). *Grem1* est nécessaire au développement du bourgeon de membre en favorisant l'établissement d'un AER fonctionnel, qui favorise ensuite la régulation de l'expression de *Shh* et la progression du développement du bourgeon de membre (Khokha, 2003 ; Michos, 2004). L'expression de *Grem1* est d'abord restreinte au mésenchyme distal du bourgeon de membre avec une plus forte concentration dans la région postérieure, mais son expression prend une légère expansion antéro-distale dans un second temps (Zuniga, 1999; Zuniga, 2004). La diminution de l'expression de *Shh* et une perte de l'expression des FGFs induit le développement d'un AER désorganisé lors de l'inactivation de *Grem1* (Michos, 2004). Les mutants homozygotes *Grem1*^{-/-}, ainsi que les mutants *ld*, présentent aussi des défauts d'organisation des différents éléments squelettiques du membre et un autopode présentant un phénotype d'oligodactylie (Khokha, 2003 ; Michos, 2004 ; Zuniga, 2004 ; Pavel, 2007). Ces

résultats suggèrent que l'action antagoniste médiée par *Grem1* sur la signalisation BMP est essentielle pour la progression de la croissance et de la structuration du bourgeon de membre.

En résumé, la croissance du bourgeon de membre nécessite l'établissement d'une boucle de rétrocontrôle positive SHH – GREM1 – FGFs entre le mésenchyme du bourgeon et l'AER. Cette boucle est composée de *Grem1* au niveau du mésenchyme, qui antagonise la signalisation BMP sur l'AER permettant ainsi la transduction du signal de la ZPA vers l'AER. Cette dernière pourra alors favoriser un gain de l'expression des différents *Fgfs* qui vont ensuite permettre le maintien de l'expression de *Shh* au niveau de la ZPA (Figure 1.6).

1.4.2 La régulation de l'expression de *Grem1*

La régulation transcriptionnelle de l'expression de *Grem1* dans les bourgeons de membres de souris est médiée par plusieurs éléments *cis*-régulateurs localisés dans le locus *limb deformity (ld)*, qui englobe le gène *Formin1 (Fmn1)*, localisé à environ 32 kb en amont de *Grem1* (Zuniga, 1999a ; Zuniga, 2004 ; Zhou, 2009 ; Zuniga, 2012 ; Li, 2014a). Il a été démontré que des mutations au niveau du locus *ld* induisent des malformations du membre en perturbant la signalisation entre les centres signalétiques du mésenchyme, la ZPA, et de l'épithélium, l'AER (Zuniga, 2004 ; Zhou, 2009). Cependant, ces mutations *ld* perturbent en fait l'expression du gène voisin, *Gremlin1*, démontrant de ce fait l'importance de cet antagoniste des BMPs lors de la morphogenèse du membre (Khokha, 2003 ; Zuniga, 2004). Cette étude a aussi permis de démontrer que les défauts morphologiques découlant des mutations *ld* est en fait une conséquence de l'altération d'un module globale de régulation de l'expression de *Grem1* plutôt que de l'altération du gène *Fmn1*.

L'activation initiale de l'expression postéro-distale de *Grem1* nécessite la signalisation BMP et la fonction des gènes des complexes *HoxA* et *HoxD* (Nissim, 2006 ; Sheth, 2013). En effet, l'application de billes imprégnées de BMP2 en présence de cycloheximide, un inhibiteur de la synthèse protéique, permet d'induire l'activation de l'expression de *Grem1* (Nissim, 2006). Tandis que l'inactivation des complexes *HoxA/D* conduit à la perte complète de l'expression de *Grem1* (Sheth, 2013). Cette étude a aussi démontré que l'expansion antéro-distale subséquente

du domaine d'expression de *Grem1* nécessite aussi les fonctions des gènes des complexes *HoxA* et *HoxD*. En effet, les embryons mutants *HoxA*^{c/-}; *HoxD*^{-/-} permettent l'activation initiale de *Grem1* dans la région postéro-distale grâce à l'allèle conditionnelle de *HoxA*; toutefois ces mutants ne présentent pas d'expansion antéro-distale subséquente de son expression (Sheth, 2013). De plus, ces embryons mutants pour les complexes *HoxA/D* présentent aussi une diminution de l'expression antérieure du facteur de croissance *Fgf10*, suggérant un rôle pour les gènes *Hox* dans la régulation de son expression (Zakany, 2007 ; Sheth, 2013). Ces résultats démontrent la nécessité fonctionnelle des gènes de la famille *Hox* pour l'expression de *Grem1*, mais également pour la croissance et le développement du bourgeon de membre. Par ailleurs, il a été démontré que *Shh* n'est pas essentiel à l'activation initiale de *Grem1*, mais il est nécessaire pour le maintien subséquent de son expression. En effet, dans les bourgeons de membres *Shh*^{-/-}, l'expression initiale de *Grem1* est présente, mais celle-ci disparaît au stade embryonnaire 10.25, démontrant l'importance de la signalisation *Shh* pour le maintien de l'expression de *Grem1* dans les bourgeons de membre de souris (Nissim, 2006).

L'expression de *Grem1* dans les bourgeons de membre est régulée par plusieurs éléments *cis*-régulateur localisés dans le gène *Fmn1* en amont de *Grem1*. Ce sont quatre éléments *cis*-régulateurs nommés GBR1-4 (« GLI Binding Region ») et un enhancer GRS1 (« Grem1 Regulatory Sequence 1 ») qui englobe les GBR1/2 (Zuniga, 2012). Il a été démontré que l'élément GRS1 est nécessaire pour l'expression postéro-distale initiale de *Grem1*, mais aussi pour l'expansion antéro-distale subséquente de son domaine d'expression (Zuniga, 2012). En effet, l'utilisation d'un transgène ayant un gène rapporteur *LacZ* sous contrôle de l'enhancer GRS1 a permis de démontrer que cet élément permet de récapituler la majorité des aspects de l'expression de *Grem1*, tandis que sa délétion conduit à la perte complète de l'expression de *Grem1* (Zuniga, 2012). Ils ont aussi démontré que l'élément GBR3 permet un renforcement de l'expression de *Grem1* dans les bourgeons de membres de souris. Finalement, l'élément GBR4, aussi nommé GRE1 (« GLI Response Element »), permet la répression de l'expression de *Grem1* dans la partie antérieure de l'autopode, suite à la liaison de GLI3R à cet élément régulateur (Zuniga, 2012 ; Li, 2014a). En effet, la délétion de cet élément régulateur, ainsi que la mutation perte-de-fonction de *Gli3*, mutation *Xt/Xt*, conduit à une expansion du domaine

d'expression de *Grem1* dans la partie antérieure de l'autopode (Zuniga, 1999a ; Zuniga, 2012 ; Lopez-Rios, 2012 ; Li, 2014a).

1.4.3 Terminaison de la boucle SHH – GREM1 – FGFs

Lors de la croissance du bourgeon de membre, il est nécessaire d'avoir une étape de terminaison de la boucle de rétrocontrôle positive, puisque le maintien de cette régulation induirait une surcroissance du bourgeon. L'expression de *Grem1* dans le membre est d'abord restreinte et ensuite terminée de façon spatio-temporelle par le facteur de transcription GLI3R. En effet, ce facteur, GLI3R favorise la sortie de l'état prolifératif des progéniteurs antérieurs et favorise la différenciation chondrogénique dépendante de la signalisation BMP (Lopez-Rios, 2012). Une autre cause de la terminaison de la boucle de rétrocontrôle positive se base sur l'observation que les cellules exprimant ou ayant exprimées *Shh*, cellules de la ZPA et ses descendants, sont réfractaires à l'activation transcriptionnelle de *Grem1* en réponse à la signalisation *Shh*. L'expansion des cellules de la ZPA conduirait alors à la cessation de l'expression de *Grem1*, qui serait suivie par la fin de l'expression de *Fgf4* et ensuite de *Shh* (Scherz, 2004). L'expansion antérieure des cellules de la ZPA entraîne un décalage du domaine d'expression de *Grem1* dans une région plus antérieure, le privant ainsi de l'influence de la signalisation SHH. Bien que ce processus soit consistant avec l'ordre auquel l'expression de ces facteurs chez le poulet cessent, ce processus ne peut s'extrapoler à la souris. Effectivement, il a été montré que l'expression de *Fgf4* est interrompue en premier, suivi par *Shh* et ensuite par *Grem1* (Verheyden, 2008). Ces résultats ont permis de suggérer la présence d'un autre élément permettant la terminaison de l'expression de *Grem1*. En effet, autant chez la souris que chez le poulet, il a été démontré que la signalisation FGF permet d'inhiber l'expression de *Grem1*, mais cette répression est dépendante d'un haut niveau d'activité des FGFs (Verheyden, 2008). De plus, une réduction de l'expression de *Grem1* permet une augmentation de la signalisation BMP qui en retour, inhibe l'expression des différents *Fgfs* de l'AER, conduisant ainsi à une abolition de la boucle de rétrocontrôle positive (Lopez-Rios, 2012).

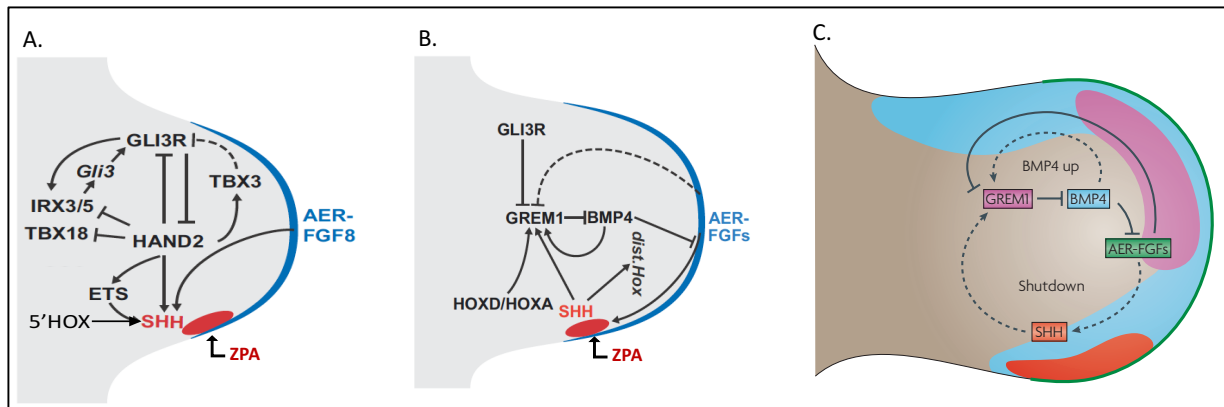


Figure 1.6 Établissement, propagation et terminaison de la boucle de rétrocontrôle positive SHH – GREM1 – FGFs. A-B. Les deux centres signalétiques de la croissance du bourgeon de membre sont indiqués sur les schéma, l'AER en bleu et la ZPA en rouge. A) L'établissement de la boucle de rétrocontrôle positive nécessite la formation d'un pré-plan d'organisation induit par les actions mutuellement antagoniste des facteurs de transcription GLI3R et HAND2, permettant d'induire un début de polarité A-P. HAND2 induit une régulation directe des gènes spécifiques aux régions postéro-distale, tout en inhibant les gènes spécifiques à l'identité proximo-antérieure. HAND2 et les gènes *5'Hox* participent à l'activation de l'expression de *Shh* au niveau de la ZPA. B) La propagation de la boucle de rétrocontrôle positive est composé d'un réseau de gènes comprenant SHH – GREM1 – FGFs. Ainsi, *Shh* régule positivement l'expression de l'antagoniste des BMPs *Grem1*, en coopération avec les gènes *5'Hox*. *Grem1* permet d'antagoniser l'inhibition de l'AER/FGFs par les BMPs, permettant alors une propagation des signalisations SHH et FGFs. C) La terminaison de la boucle de rétrocontrôle positive est une conséquence de l'écart croissant entre la signalisation SHH/ZPA et le domaine d'expression de *Grem1*. Cet écart permet aussi à la signalisation FGFs/AER d'initier l'inhibition de *Grem1*, conduisant à une augmentation graduelle de l'activité des BMPs. **A/B.** Adapté de Zuniga (2015). **C.** Adapté de Zeller (2009).

1.4.4 Spécification de l'identité des doigts

Encore présentement il n'est pas clair à quel moment l'identité des différents doigts composant l'autopode est déterminé. Des expériences de manipulation du bourgeon de membre chez le poulet suggèrent un mécanisme tardif de spécification identitaire des doigts, dépendant de la signalisation BMP (Drossopoulou, 2000). Ces expériences ont permis de démontrer que *Shh*

induit l'activation de *Bmp2* et il a été proposé que cette induction de *Bmp2* en plus de la signalisation longue-distance de Shh permet d'instaurer un gradient d'activité *Bmp* dans le bourgeon de membre. Ce gradient d'activité BMP permettrait ensuite de spécifier l'identité des doigts le long de l'axe A-P (Drossopoulou, 2000). Il a été démontré qu'une modification du niveau d'expression des *Bmp* dans les régions interdigitales peuvent induire des changements d'identité A-P des doigts de l'autopode (Dahn, 2000 ; Bandyopadhyay, 2006). La signalisation BMP au niveau du mésenchyme interdigital semble ainsi agir sur une région localisée directement sous l'AER, à l'extrémité distale des condensations digitales appelées PFRs (« Phalanx-forming region ») (Dahn, 2000). Chez le poulet, ces PFRs sont caractérisées par différents niveaux de signalisation BMP; un taux plus élevé afin de spécifier l'identité des doigts postérieurs et un taux plus faible pour la détermination de l'identité antérieure des doigts (Dahn, 2000 ; Suzuki, 2008). Néanmoins, ce résultat n'est pas supporté par les nouvelles données moléculaires concernant le taux de signalisation BMP, puisqu'il a été démontré que le PFR du doigt IV (à identité postérieure) présente le plus faible niveau d'activité de la signalisation BMP (Suzuki, 2008). Shh n'est pas la seule molécule participant à l'établissement du gradient de signalisation BMP. En effet, des analyses génétiques chez la souris a récemment démontré la nécessité d'une balance entre les facteurs de transcriptions GLI3 et 5'HOXD dans les régions interdigitales (Huang, 2016). L'expression graduelle le long de l'axe A-P des gènes 5'*HoxD* en fonction du gradient A-P de l'expression de *Gli3*, permettrait de produire une activité différentielle des BMP dans les différentes régions interdigitales et ainsi influencerait la formation des phalanges via les PFRs et l'identité des doigts (Huang, 2016). Finalement, d'autres analyses génétiques chez la souris suggèrent que l'antagonisme mutuelle entre les gènes 5'*HoxD* et les gènes de la famille *Sall* (« *Sal-like protein* ») permettrait d'affiner l'activité locale des gènes 5'*HoxD* (Kawakami, 2009).

1.5 De la polydactylie à l'oligodactylie

1.5.1 *Gli3* et la polydactylie du mutant « Extra-toe »

Les différentes mutations affectant le gène *Gli3* sont caractérisées phénotypiquement par le développement d'un autopode polydactyle. Le phénotype de polydactylie est généralement le résultat d'une altération de l'axe antéro-postérieur lors du développement de l'autopode et l'un des acteurs principaux de la polarité de cet axe est le morphogène SHH. Lors de la spécification A-P du bourgeon de membre, *Gli3* participe à l'établissement d'un pré-plan d'organisation du bourgeon via son antagonisme avec *Hand2*, résultant en une restriction de chacun de ces facteurs, *Gli3* étant restreint au domaine antérieur et *Hand2* au domaine postérieur (te Welscher, 2002). Cette restriction des domaines d'expression permet d'initier la polarisation du bourgeon et de localiser l'expression de *Shh* au niveau de la ZPA dans la région postérieure (Büscher, 1997). Les mutations pertes-de-fonctions du gène *Gli3*, tel que la mutation « Extra-toes » (*Xt*) induit le développement d'une polydactylie préaxiale (augmentation du nombre de doigt du côté antérieur de l'autopode) et une perte de l'identité des doigts antérieurs (Johnson, 1967 ; Schimmang, 1992 ; Hui, 1993). Les embryons mutants homozygotes pour la mutation *Xt* (*Gli3*^{*Xt/Xt*} appelé *Xt/Xt* par la suite) présentent des membres constitués de 6 à 8 doigts, des phalanges terminales qui peuvent être entières, dupliquées ou absentes, une séparation entre les différents doigts moins complète (syndactylie) et finalement, une difficulté à identifier individuellement les os des carpes, dû à la fusion de certains éléments osseux (Johnson, 1967). De plus, les embryons de souris *Xt/Xt* présentent une réduction de l'expression des gènes de l'identité antérieure et une désorganisation des domaines d'expression des gènes plus spécifiques à l'identité postérieure, tel que les gènes *5'HoxD* et *Grem1* qui présentent une expansion antérieure ectopique de leur domaine d'expression (Masuya, 1995 ; Büscher, 1997 ; Lopez-Rios, 2012).

1.5.2 Les gènes *Hox* et la polydactylie

Le développement des doigts chez les vertébrés nécessite l'interaction des gènes postérieurs des complexes *HoxA* et *HoxD*. À un stade plus précoce, ce sont les gènes *Hoxa13* et *Hoxd13* qui présentent les domaines d'expression les plus restreint vers la région postéro-distale du bourgeon de membre (Dollé, 1989). Cependant, à un stade plus tardif les gènes *Hoxd11*, *Hoxd12* et *Hoxd13* sont séquentiellement activés distalement dans tout le territoire de l'autopode, tout comme *Hoxa13* (Haack, 1993 ; Duboule, 1994). De façon intéressante, les gènes *Hoxd13* et *Hoxa13* ne fournissent pas seulement la compétence de former des doigts, mais ils ont aussi la capacité de moduler le nombre de doigts. En effet, il a été démontré que l'inactivation du gène *Hoxd13* affecte davantage les structures postaxiales, conduisant à une réduction globale de la taille des doigts avec la présence d'un doigt surnuméraire dans la plupart des cas (Dollé, 1993 ; Kmita, 2002). Cependant, la délétion simultanée de *Hoxd13* et *Hoxd12* induit le développement d'un membre polydactyle, tout comme la triple délétion *Hoxd11* à *Hoxd13* (Zakany, 1997). L'inactivation du gène *Hoxa13* induit plutôt un phénotype d'oligodactylie, avec la perte du doigt le plus antérieur, le doigt I et des altérations de structures de certains os des carpes (Fromental-Ramain, 1996). Le phénotype des embryons *Hoxa13*^{-/-} semble être la conséquence d'un retard ou d'un arrêt de la séquence d'évènements permettant la formation de l'autopode. En effet, les structures qui se développent mal ou ne se développent pas chez ces mutants, sont les dernières structures apparaissant lors du développement du bourgeon de membre (Fromental-Ramain, 1996). Cependant, l'inactivation simultanée des gènes *Hoxa13* et *Hoxd13* conduit au développement d'un membre caractérisé par une agénésie complète des doigts (Fromental-Ramain, 1996). Ces expériences de pertes-de-fonctions ont contribué à démontrer l'importance des gènes 5'*Hox* lors de la spécification des différents doigts composants l'autopode.

1.5.3 La polydactylie des mutants *Gli3*; 5'*Hox* et le mécanisme de type Turing

L'effet des gènes 5'*Hox* sur la modulation du nombre de doigt est bien documenté, mais leurs rôles exacts dans ce processus est moins clair, une explication possible est leurs nombreuses interactions avec la voie de signalisation SHH-GLI3 (Büscher, 1997 ; Zackany, 1999 ; Zuniga,

1999). Ces interactions incluent la restriction postérieure des gènes 5'*Hoxd* par le facteur GLI3R, la participation à l'activation de l'expression de *Shh* par les gènes 5'*Hox* et l'interaction physique HOXD12 – GLI3R qui conduit au blocage de l'activité répressive de GLI3R (Chen, 2004). L'inactivation des gènes 5'*HoxD* (*Hoxd11*, *Hoxd12* et *Hoxd13*) en combinaison avec la mutation *Xt/Xt* (perte-de-fonction *Gli3*) induit le développement d'une polydactylie *Gli3* exacerbée, suggérant une relation négative entre les gènes 5'*HoxD* et le contrôle du nombre de doigt (Sheth, 2007). En effet, le simple mutant *Xt/Xt* présente un autopode composé de 8 ou 9 doigts, tandis que le double mutant *Xt/Xt*; 5'*HoxD* présente un autopode pouvant développer jusqu'à 11 doigts. Cependant, les bourgeons de membre de ces souris présentent aussi un gain d'expression de *Hoxa13*. Le double mutant *Xt/Xt*; *Hoxa13*^{-/-} présentent également un membre polydactyle, dont la polydactylie est caractéristique de l'inactivation du gène *Gli3*, avec le développement de 6 à 8 doigts, suggérant que *Hoxa13*, tout comme les gènes 5'*HoxD*, semble avoir un effet négatif sur le développement du nombre de doigt (Sheth, 2012). Par contre, dans ce double mutant on ne peut exclure que la polydactylie soit due au gain antérieur ectopique de l'expression des gènes *Hoxd12* et *Hoxd13*, qui est également observé dans les bourgeons des simples mutants *Xt/Xt*. La génération d'embryons triple mutant *Hoxa13*^{-/-}; 5'*Hoxd*^{Del11-13}; *Gli3*^{Xt} a permis d'analyser l'effet de l'inactivation combinées des gènes 5'*Hox* et *Gli3* dans la modulation du nombre de doigts. L'analyse squelettique des différents mutants démontre une série de défauts structurels de l'autopode incluant de la syndactylie et de la brachydactylie. Le plus intéressant reste l'exacerbation marquée de la polydactylie chez ces mutants, où le nombre de doigt en développement peut atteindre 14 (Sheth, 2012). Les résultats découlant de ces analyses, à savoir l'augmentation du nombre de doigts ainsi que la réduction de la largeur des doigts et de l'espace interdigital, ont conduit à la conclusion que les gènes 5'*HoxD* et *Hoxa13* contrôlent le nombre de doigts selon un mécanisme de type Turing (Sheth, 2012). Ce mécanisme de réaction-diffusion de Turing, stipule que l'interaction de molécules diffusibles, activatrices et inhibitrices, définissent éventuellement la longueur d'onde d'un motif constitué de lignes ou de points (Turing, 1952 ; Raspopovic, 2014). Il a été suggéré que les acteurs principaux du mécanisme de type Turing qui permettrait de définir le destin des zones spécifiques à la formation des doigts ou de l'espace interdigital, implique *Sox9* et des gènes impliqués dans les voies de signalisation BMP et WNT (Raspopovic, 2014). En effet, de ce nœud central SOX9, BMP et WNT ; deux interactions sont claires : l'influence positive de la signalisation BMP sur

l'expression de *Sox9* et l'inhibition de *Sox9* par la signalisation WNT (Zehentner, 2002 ; Brandyopadhyay, 2006 ; Hill, 2005 ; ten Berge, 2008). Par ailleurs, la modélisation mathématique combinée aux données génétiques a permis de démontrer que les gènes *Hox13* étaient des modulateurs de la longueur d'onde caractérisant le mécanisme de Turing (Sheth, 2012 ; Raspopovic, 2014).

1.5.4 La polydactylie du mutant RA11KI

Dans les bourgeons de membre antérieurs et postérieurs, l'expression des gènes distaux du complexe *HoxA* présentent des domaines d'expression mutuellement exclusifs. En fait, l'expression de *Hoxa11* est restreinte à la partie proximale, alors que l'expression de *Hoxa13* est restreinte à l'autopode (Figure 1.7 A) (Sheth, 2014 ; Kherdjemil, 2016). Il a été démontré que cette restriction proximale de *Hoxa11* était exercée par la liaison des facteurs de transcription HOX13 à un élément *cis*-régulateur localisé dans l'intron de *Hoxa11*. En effet, la liaison des FTs HOX13 à cet élément induit la transcription antisense d'un long ARN non-codant au niveau du locus *Hoxa11* (Kherdjemil, 2016). Le laboratoire a donc décidé de générer une lignée de souris, par recombinaison homologe, contenant un allèle gain-de-fonction conditionnel de *Hoxa11* au niveau du locus *Rosa26*, afin d'exprimer *Hoxa11* de façon ectopique dans la région distale de l'autopode (Kherdjemil, 2016). Cette expression ectopique de *Hoxa11*, la lignée RA11KI, induit le développement d'un membre avec des doigts surnuméraires et caractérisé par de la polydactylie pré- et post-axiale (Figure 1.7 B). D'ailleurs, il a été démontré que la polydactylie résultant de l'expression distale de *Hoxa11* est associée à une diminution de l'expression des gènes de l'identité antérieure de l'autopode, tel que *Pax9*, *Irx3/5*, *Alx4* et *Lhx9* (Kherdjemil, 2017). De plus, les différents gènes spécifiques de l'identité postérieure, *Grem1*, *Jag1* ou encore les gènes *5'HoxD*, présentent une antériorisation de leur domaine d'expression (Kherdjemil, 2017). L'expansion antérieure du domaine d'expression de *Grem1* dans ces bourgeons de membres suggère un renforcement de la boucle de rétrocontrôle SHH – GREM1 – FGFs, ce qui concorde avec le gain antérieur du domaine d'expression de *Fgf8* au niveau de l'AER (Norrie, 2014 ; Kherdjemil, 2017). De plus, la polydactylie résultant du gain-de-fonction de *Hoxa11* permet de reconsidérer le phénotype de polydactylie observé chez les embryons mutants *5'HoxD^{Del11-1/Del11-133}* ; *Hoxa13^{-/-}*, *Xt/Xt* qui pourrait être une conséquence du gain-de-

fonction de *Hoxa11* dans ces bourgeons de membres, plutôt qu'une diminution des gènes 5'*Hox*. De même, les gènes dont l'expression est dérégulée chez les embryons *RA11KI*, sont des gènes qui nécessitent aussi la fonction de *Gli3* et qui se retrouvent altéré dans les bourgeons des embryons *Xt/Xt*. Cependant, la combinaison des mutations *Xt* et *RA11KI* induit le développement d'un membre oligodactyle chez les embryons homozygotes, avec la formation de moins de cinq doigts (Figure 1.7 C) (Kherdjemil, 2017). Ce résultat permet de démontrer que la polydactylie du mutant *RA11KI* est dépendante de la fonction de *Gli3*.

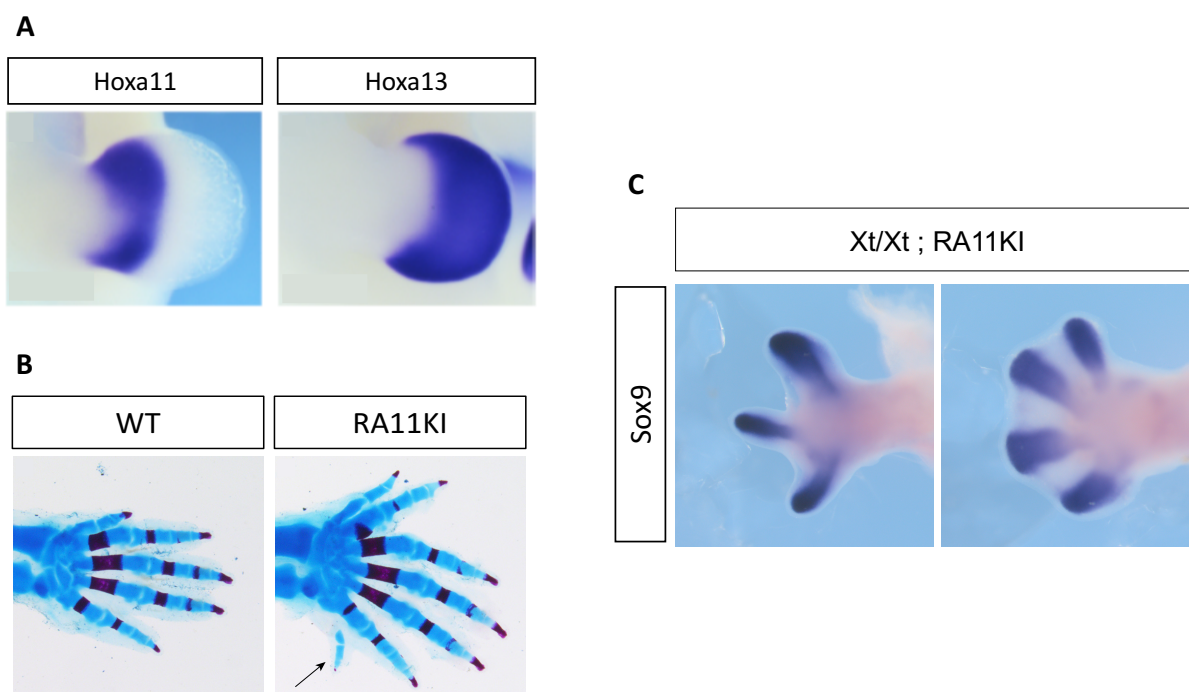


Figure 1.7 L'expression distale ectopique de *Hoxa11* induit le développement d'un membre polydactyle en présence de *Gli3*, mais conduit au développement d'un membre oligodactyle en absence de *Gli3*. A) Dans un contexte sauvage, les domaines d'expression des gènes 5'*HoxA* sont mutuellement exclusifs. L'expression de *Hoxa11* est restreinte à la partie proximale de l'autopode, tandis que l'expression du gène *Hoxa13* est restreinte à la partie distale. B) L'expression ectopique du gène *Hoxa11* dans la partie distale de l'autopode conduit au développement d'un membre polydactyle avec la présence de doigts surnuméraires en pré- et post-axiale. C) L'expression ectopique distale de *Hoxa11*, dans un fond génétique mutant pour *Gli3* (mutation *Xt/Xt*) induit le développement d'un membre oligodactyle (moins de 5 doigts). Adapté de Kherdjemil (2016, 2017).

1.6 Projet de recherche

Lors du développement embryonnaire, la fonction des gènes des complexes *HoxA* et *HoxD* est nécessaire pour le développement des membres le long des axes A-P et P-D. Lors du développement de l'autopode, les domaines d'expression des gènes *Hoxa11* et *Hoxa13* sont mutuellement exclusifs. En effet, *Hoxa13* est restreint à la partie distale de l'autopode tandis que le domaine d'expression de *Hoxa11* est restreint à la partie proximale. Cette restriction est régulée par les protéines HOX13 qui se lient à un élément *cis*-régulateur localisé dans l'intron de *Hoxa11*. La génération d'une lignée de souris « knock-in » pour *Hoxa11* (lignée *RA11KI*) permet l'expression de ce gène dans tout le membre, conduisant au développement d'un membre polydactyle. Cependant, en combinant les mutations *Xt* et *RA11KI* chez la souris, nous avons observé le développement d'un membre oligodactyle. De plus, le mutant *Grem1*^{-/-} présente aussi un phénotype d'oligodactylie, tout comme le double mutant *Xt; ld*. Finalement, il a été démontré que *Grem1* est une cible directe des gènes *Hoxa13* et *Hoxd13* (Sheth, 2013)

1.6.1 Hypothèse

En se basant sur ces observations, nous avons émis l'hypothèse que les gènes *Hoxa11* et *Gli3* participent à la formation des doigts et leurs rôles dans ce processus sont interdépendants dans un contexte gain-de-fonction pour *Hoxa11*.

1.6.2 Objectifs

En utilisant des approches génomiques, notre objectif est de caractériser l'effet de l'expression ectopique du facteur de transcription HOXA11 dans la modulation du nombre de doigts. Pour ce faire, nous avons effectué une analyse ChIP-Seq (immunoprécipitation de la chromatine suivi d'un séquençage à haut débit) chez les différents mutants pour la marque H3K27Ac, modification épigénétique généralement associée aux promoteurs et enhancers actifs. En comparant ces résultats avec les résultats préalablement obtenus dans le laboratoire, concernant les niveaux d'expression des gènes et la liaison du FT HOXA11, il sera possible de caractériser

l'effet de *Hoxa11* sur les différents éléments régulateurs impliqués dans la modulation du nombre de doigts.

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

2.1 Lignées de souris

Les lignées de souris utilisées sont les suivantes : *Prx1Cre*; *Rosa26^{Hoxa11/Hoxa11}* (*RA11KI*) (Figure 2.1) (Kherdjemil, 2016), *Gli3^{XtJ/XtJ}* (*Xt/Xt*) (Hui, 2016). Les souris *Xt*; *RA11KI* sont obtenus suite au croisement des souris *Prx1Cre*; *Rosa26^{Hoxa11/Hoxa11}* et *Gli3^{XtJ/XtJ}*. Les souris ainsi que les embryons sont génotypés par PCR en utilisant l'ADN génomique extrait des biopsies de queue et des sacs vitellins. Les amorces utilisées pour le génotypage sont résumées dans le tableau I. Après la dissection des embryons, ils sont fixés 12 heures dans la PFA 4% (paraformaldéhyde) (Sigma-Aldrich, réf. #P6148). Ensuite, la déshydratation des embryons consiste à immerger les embryons 10 min dans les solutions suivantes : PBS (Tampon phosphate salin), PBST (PBS (Invitrogen, réf. # 2160069) + Tween 20 0.1% (BioShop, réf. #TWN510.500)), 30% MeOH/PBST (Méthanol), 50% MeOH/PBST, 70% MeOH/PBST, 100% MeOH. Les embryons sont conservés à -20°C dans une solution 100% MeOH.

Tableau I : Amorces utilisées pour le génotypage des lignées de souris

Nom	# de référence	Séquence nucléotidique	Résultats
<i>Gli3</i> – Wt – Fw	117	5'-GGG TGA ACA GCA TCA AAA TG-3'	427 pb
<i>Gli3</i> – Wt – Rv	118	5'-ATA GCC ATG TTG GTG GTG CC-3'	
<i>Xt</i> – Fw	119	5'-TAC CCC AGC AGG AGA CTC AG-3'	600 pb
<i>Xt</i> – Rv	120	5'-AAA CCC GTG GCT CAG GAC AA-3'	
CRE – F	316	5'-AGG TGT AGA GAA GGC ACT TAG C-3'	412 pb
CRE – R	317	5'-CTA ATC GCC ATC TTC CAG CAG G-3'	
RA11KI_wt_fw	483	5'-GCA ATA CCT TTC TGG GAG TTC T-3'	384 pb
RA11KI_wt_rev	484	5'-TCG GGT GAG CAT GTC TTT TAA TC-3'	
RA11KI_flox_rev	485	5'-TTC AAT GGC CGA TCC CAT ATT-3'	881 pb

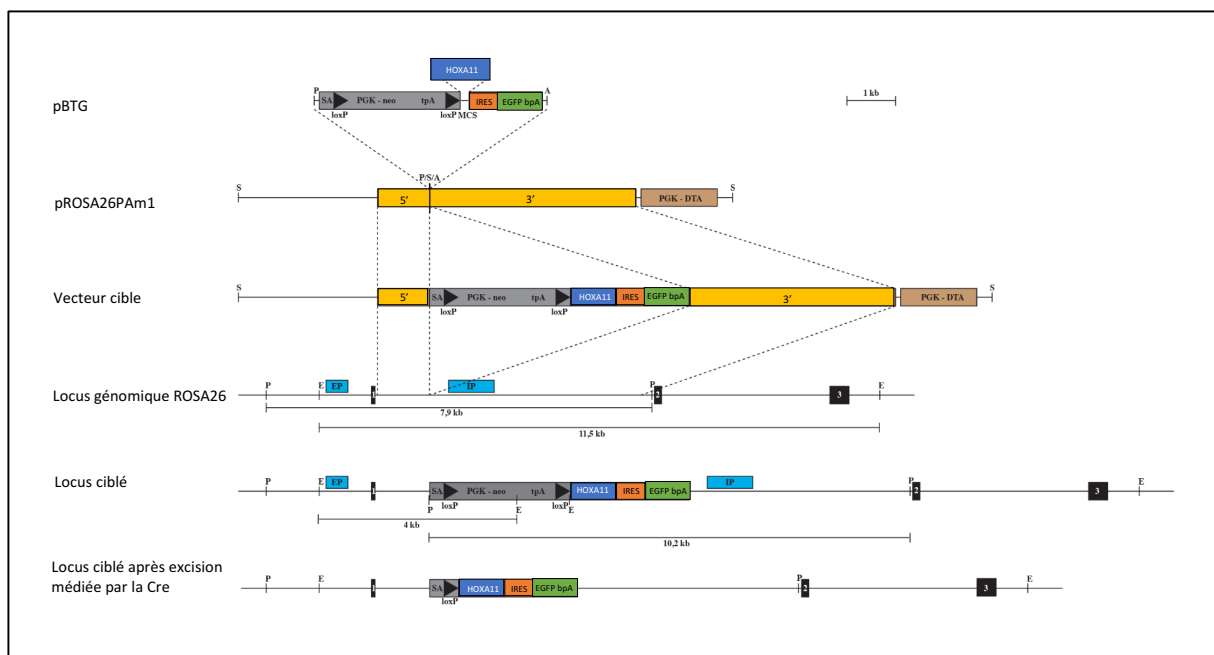


Figure 2.1 Génération de la lignée de souris RA11KI. Les 3 premières lignes représentent le ciblage du locus endogène Rosa26. La 4^e ligne représente le locus ROSA26 de type sauvage. Les régions utilisées pour la recombinaison homologue dans les cellules ES sont représentées par un rectangle jaune. La dernière ligne représente le schéma du locus ciblé suite à la recombinaison homologue dans les cellules ES et suite à la recombinaison médiée par la Cre recombinase. Adapté de Kherdjemil (2016)

2.2 Synthèse des sondes ARNs

La synthèse des sondes ARNs antisens a été effectuée par PCR. Les plasmides contenant la séquence des gènes d'intérêt, ont été linéarisés par digestion enzymatique avec l'enzyme BamH1 (NEB, réf. # R0136S). Les sondes (*Sox9* et *Grem1*) ont été étiquetées lors de la synthèse par l'incorporation de DIG ARN (Roche DIG RNA labeling Mix, 10X, réf. # 11277073910) et l'ARN polymérase utilisée est la T7 (NEB, 50U/ μ L, réf. # M0251S). Le contrôle de la réaction de synthèse est effectué par électrophorèse sur gel d'agarose 1.2% (Agarose A, Bio Basic, réf. # D0012). Les sondes sont purifiées avec le kit illustra MicroSpin G-50 Columns (GE Healthcare Life Sciences, réf. #27533001) et conservées à -20°C jusqu'à leur utilisation pour les hybridations *in situ*.

2.3 Whole-Mount *in situ* Hybridization (WISH)

Les embryons sont réhydratés suivant l'ordre inverse des solutions de déshydratation commençant par la solution 70% MeOH/PBST pour terminer dans du PBST. Les embryons sont blanchis par du peroxyde d'hydrogène 6% pour 1h, suivi d'une perméabilisation des membranes par la protéinase K (Life Technology, réf. # 25530015) à 10 $\mu\text{g/ml}$ de PBST 12 min RT° (température pièce). La perméabilisation est arrêtée par un traitement de glycine à 20 $\mu\text{l/ml}$ (Sigma-Aldrich, réf. # G7403) pendant 5 min sur glace, puis les embryons sont incubés dans la PFA 4% pour 20 min à RT°. La pré-hybridation des sondes nécessite une incubation des embryons 5 min dans le tampon H1/L1 (Formamide dé-ionisé 50% (Invitrogen, réf. # 15515026), SSC 5X pH4.5, 1% SDS (Wisent, réf. # 800-100-CG), 0.1% Tween, H₂O milliQ autoclavé), suivi de 2h dans du tampon H2 (50 mL de solution H1/L1 auquel on ajoute 250 mg de RNA torula (Sigma-Aldrich, réf. # R6625-25g) et 25 μL heparin à 100 mg/mL (Sigma-Aldrich, réf. # H5515-100KU)) à 68°C. 1 μL de sondes est dénaturée dans 1 mL de tampon H2 pendant 10 min à 80°C. Les embryons sont incubés dans 1 mL de sondes/tampon H2 O/N à 68°C. Les embryons sont lavés dans du tampon H1/L1 3x30 min, du tampon L2 (Formamide dé-ionisé 50%, 5X SSC pH4.5, 0.1% Tween 20, H₂O milliQ autoclavé) 3x30 min et du tampon L3 (2X SSC pH4.5, 0,1% Tween 20, H₂O milliQ autoclavé) 1x15 min à 68°C. Suivi d'un lavage 1x15 min dans le tampon L3 à RT°. Suivi d'une période de blocage de 2h composée de 2% de sérum de chèvre (GS) (Invitrogen, réf. # 16210-064) + 2 mg/mL de BSA (Sérum d'albumine bovin) (Fisher Scientific, réf. # BP-1605-100) par mL de TBST 1% à RT°. Le blocage est suivi d'une incubation O/N à 4°C dans la même solution (GS + BSA) auquel est ajouté l'anticorps anti-DIG Fab fragment 1:3000 (Roche, 150U, réf. # 11207733910). Le jour 3 est composé de plusieurs lavages dans du TBST 1% à RT° et conservé O/N dans du TBST 1% à 4°C. Les embryons sont lavés 3x10 min dans une solution de NTMT (100 mM NaCl (Wisent, réf. # 600-082-IK), 100 mM Tris 1M pH9.5, 1% Tween 20, H₂O milliQ autoclavé) à RT°. Suivi de l'étape de révélation composé de 1 μL de NBT à 0.1 mg/mL (Roche, réf. # 11383213001) + 3.5 μL BCIP à 0.15 mg/mL (Roche, réf. # 11383221001) par mL de NTMT à la noirceur à RT°. La révélation est arrêtée par des lavages au PBST et les embryons marqués sont conservés dans la PFA 4% à 4°C.

Les images des embryons ont été acquises à l'aide du logiciel Leica Application Suite v.4.3.0 associé à une caméra Leica DFC450C et à un microscope Leica M165FC. Les images ont été éditées avec le logiciel Adobe Photoshop à l'aide de la fonction contraste/sans luminosité.

2.4 ChIP-Seq

L'immunoprécipitation de la chromatine a été effectuée à partir de bourgeons de membres récoltés au jour embryonnaire 11.5 issue de souris CD1 (Wt), *Xt/Xt*, *RAl1KI* et *Xt; RAl1KI* dans du PBS 1X froid. Les bourgeons ont été homogénéisés par pression mécanique avec un pilon, puis la chromatine a été « crosslinked » avec 1% de formaldéhyde (Sigma-Aldrich, réf. # F8775) pour 13 min à RT°. Le « crosslinking » a été arrêté avec 125 mM de glycine pendant 10 min sur glace, suivi d'une étape de centrifugation 4000 rpm 3 min à 4°C. Le supernageant a été retiré, les culots ont subi un « Snap-freeze » dans la glace sèche et sont conservés à -80°C. La sonication de la chromatine a été faite avec un sonicateur manuel « Fisher Scientific Sonic Dismembrator Model 100 » afin d'obtenir des fragments de taille moyenne entre 100 et 600 pb. Les débris cellulaires ont été retirés par centrifugation à 12500 rpm pendant 4 min à 4°C et des aliquots ont été prélevés afin de quantifier et de confirmer la longueur des fragments. 3 µg d'anticorps anti-H3K27Ac (anti-Histone H3 (acetylK27), Abcam, réf. # ab4729) ont été incubés avec une quantité égale de protéines « Dynabeads » A (Invitrogen, réf. # 100-01D) et G (Invitrogen, réf. # 100-04D) pour 6h à 4°C, avant d'y ajouter la chromatine pour incubation O/N. La chromatine immunoprécipitée a été lavée successivement dans le tampon I (1% Triton (Sigma-Aldrich, réf. # T9284), 0,1% SDS, 150 mM NaCl, 20 mM Tris pH8, 2 mM EDTA (Invitrogen, réf. # 15576028)), le tampon II (1% triton, 0,1% SDS, 500 mM NaCl, 20 mM Tris pH8, 2 mM EDTA), le tampon III (1% NP-40 (BioBasic, réf. # NDB0385), 250 mM LiCl (Sigma-Aldrich, réf. # L9650-100G), 10 mM Tris pH8, 1 mM EDTA) et le tampon IV (50 mM NaCl, 10 mM Tris pH8, 1 mM EDTA). Les complexes protéines/ADN ont été dissociés suite à une incubation O/N dans le tampon E (1% SDS, 50 mM Tris pH8, 10 mM EDTA) à 65°C dans un bain d'eau. Les échantillons ont ensuite été traités à la RNase 100X pour 15 min à RT°, suivi d'un traitement à la protéinase K à 20mg/ml pour 1h à 65°C. L'ADN des échantillons a été purifié sur colonne

QIAquick (Qiagen, réf. # 28104) et la qualité a été contrôlée avec le bioanalyseur Agilent. Ensuite, la librairie pour le ChIP-Seq a été préparé par la plateforme de Biologie moléculaire de l'IRCM en utilisant la trousse de préparation de librairie Illumina TruSeq suivi par le séquençage effectué par GénomeQc sur le séquenceur Illumina HiSeq 2000 à 50 cycles et dans une configuration « paired-end ».

2.5 Analyse bio-informatique avec la plateforme en ligne Galaxy

Les fichiers séquençés reçu par GénomeQc ont été importés sur la plateforme Galaxy. Ces fichiers contenant les données brutes sont sous format fastQ et ils ont été convertit en format Fastqsanger afin d'être pris en charge par l'outils « FastQC » (Version 0.72) de Galaxy. L'analyse a été effectué suivi d'une analyse « MultiQC » (Version 1.6) permettant la sortie d'un rapport conjoint de tous les résultats. L'alignement des séquences s'effectue avec l'outils « Bowtie2 » (Version 2.3.4.2) en utilisant les paramètres par défaut. La librairie a été construite sous format « paired-end » et les séquences ont été alignées sur le génome de référence *Mus musculus* mm10. Le retrait des séquences dupliquées a été effectué avec l'outils « MarkDuplicate » (Version 2.18.2.1) selon les paramètres par défauts. Ces séquences alignées sont en format « .bam », l'outils « bamCoverage » (Version 3.1.2.0.0) permet de convertir les fichiers bam en fichier « .bigwig » afin de visualiser les résultats avec le programme IGV (« Integrative Genomics Viewer », Version 2.4.6). L'appel des pics est effectué avec l'outils « MACS2 callpeak » (Version 2.1.1.20160309.4). Dans cette analyse nous avons utilisé le fichier séquençé « Input » comme « Control File ». Le paramètre « Do not build the shifting model » a été utilisé et le paramètre pvalue supérieure à 0.05 a été sélectionné.

2.6 Analyses bio-informatique avec la plateforme interactive EaSeq

Pour les analyses subséquentes, les fichiers « peaks.xls » ont été exporté de Galaxy afin d'être utilisé comme « Regionset » sur la plateforme EaSeq (Version 1.05). Les fichiers bam sortant de l'analyse d'alignement sont exportés et utilisés comme « Dataset », tandis que le « Geneset » est spécifié au génome de référence mm10. L'annotation des pics a été effectué avec l'outil

« Annotate » disponible sur EaSeq en sélectionnant les paramètres « Start & End » et l'annotation a été effectuée en fonction du génome de référence mm10. Ensuite, les fichiers ont été classés en fonction de leur pvalue avec l'outil « Sort » et en sélectionnant le paramètre « Reverse ». L'analyse de la corrélation a été effectuée avec l'outil « Correlate » permettant de corréler deux ChIP à la fois, avec les paramètres : « Windows size 500 pb », « > = 100 reads », « 500 reads ». L'analyse de la corrélation a été suivi d'une analyse de co-localisation des pics entre les différents génotypes analysés par ChIP-Seq. L'outil « Gate » a permis de classer les listes en fonction de leur pvalue supérieure à 10^{-20} . L'outil « Coloc » a été utilisé avec le paramètre « Center » pour chaque duo d'analyse (Xt vs Wt, Xt vs RA11KI, etc.). Les listes sortantes ont ensuite été classées en fonction de « colocalize » ou « ≠ colocalize » et l'outil « Overlap » a permis de visualiser ces listes sous forme de diagramme de Venn.

2.7 Approbation de l'étude

Toutes les expérimentations animales décrites dans ce mémoire ont été approuvées par le comité des animaux de l'Institut de Recherche Clinique de Montréal (IRCM). Protocole 2015-14.

Chapitre 3 : Résultats

3.1 Contribution des auteurs

Figures

Figure 3.1 : Yacine Kherdjemil

Figure 3.2 : Mariane C.Fugulin, Yacine Kherdjemil

Figure 3.3 : Mariane C.Fugulin

Figure 3.4 : Mariane C.Fugulin

Figure 3.5 : Mariane C.Fugulin

Figure 3.6 : Mariane C.Fugulin, Yacine Kherdjemil, Alexandre Mayran, Rushikesh Sheth, Ines Desanti

Figure 3.7 :

A. Yacine Kherdjemil, Alexandre Mayran

B. Mariane C.Fugulin, Yacine Kherdjemil, Alexandre Mayran, Rushikesh Sheth, Ines Desanti

Figure 3.8 : Mariane C.Fugulin, Yacine Kherdjemil, Alexandre Mayran, Rushikesh Sheth, Ines Desanti

Approche génomique

Expérience de ChIP-Seq H3K27Ac : Mariane C.Fugulin

Expérience de ChIP-Seq HOXA11 (Wt) : Yacine Kherdjemil et Alexandre Mayran

Expérience de ChIP-Seq HOXA11 (*RAI1KI*) : Ines Desanti et Alexandre Mayran

Expérience de ChIP-Seq HOX13 : Rushikesh Sheth

Expérience de RNA-Seq : Yacine Kherdjemil et Alexandra Mayran

3.2 Les bourgeons de membres mutants *Xt*; *RA11KI* présentent une variation du domaine d'expression de *Grem1*

L'analyse génétique chez la souris des mutants porteuses de gains et pertes-de-fonctions pour les gènes *5'Hox* et le gène *Gli3* a démontré leur importance lors de la modulation du nombre de doigts, ainsi que les nombreuses interactions physiques et génétiques entre ces facteurs (Johnson, 1948 ; Dollé, 1993 ; Hui, 1993 ; Fromental-Ramain, 1996 ; Chen, 2004 ; Sheth, 2007 ; Sheth, 2012). Les bourgeons des embryons mutants pour le gène *Gli3* présentent une expansion antérieure des domaines d'expression des gènes spécifiques à l'identité postérieure, tel que les gènes *5'Hox*, longtemps considérés comme étant la cause de la polydactylie des mutants perte-de-fonction pour *Gli3* (Büscher, 1997). Néanmoins, l'analyse génétique des triples mutants *Xt/Xt*; *5'HoxD^{Del11-13/Del11-13}*; *Hoxa13^{-/-}* a permis de démontrer que la réduction du dosage des gènes *5'Hox* dans un fond génétique mutant pour *Gli3*, exacerbe le phénotype de polydactylie des mutants individuels (Sheth, 2007, 2012). Par ailleurs, dans un contexte de réduction de dosage des gènes *5'Hox*, les bourgeons de membres présentent une expansion distale du domaine d'expression de *Hoxa11* (Sheth, 2013). Les domaines d'expression des gènes *Hoxa11* et *Hoxa13* étant mutuellement exclusif, l'expression ectopique de *Hoxa11* dans le domaine distal conduit au développement d'un membre polydactyle (Kherdjemil, 2016). Finalement, le croisement des lignées de souris mutantes *Xt/Xt* et *RA11KI* a conduit au développement d'un membre oligodactyle, avec la formation de moins de cinq doigts. Ce résultat suggère ainsi que la polydactylie du mutant *RA11KI* est dépendante de *Gli3*. Pour ces raisons, nous avons effectué une analyse phénotypique des mutants multiples *Gli3* (*Xt*) et *RA11KI*. Afin de pouvoir observer le nombre de doigts en formation, nous avons procédé à des expériences d'hybridation *in situ*, avec une sonde ARN pour le gène *Sox9*, ce gène étant un marqueur des condensations mésenchymateuses (Bi, 1999). Les embryons de types sauvages présentent un phénotype normal de pentadactylie, avec la formation de cinq doigts distincts (Figure 3.1A). Les embryons homozygotes pour la mutation *Xt*, perte-de-fonction de *Gli3*, ou les embryons mutants gain-de-fonction pour *Hoxa11* (les embryons *RA11KI*) présentent tous des membres polydactyles (Figure 3.1B, C). Cependant, nous pouvons remarquer que le mutant *Xt/Xt* présente toujours un autopode composé de plus de doigt que l'autopode du mutant *RA11KI*. Le triple mutant

conditionnel *Xt/Xt; Prx1Cre; RAI1KI* (appelé *Xt; RAI1KI* pour la suite), quant à lui, présente toujours un membre oligodactyl, avec la formation de moins de 5 doigts. Cependant, même si la réduction du nombre de doigts est toujours observée chez ces mutants, le phénotype est tout de même variable dans sa sévérité, puisque nous observons parfois un membre constitué de trois doigts et parfois de quatre doigts (Figure 3.1 D, E).

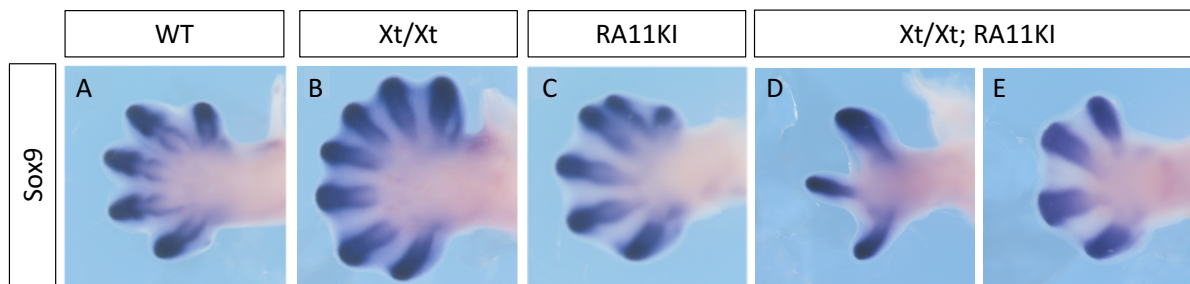


Figure 3.1 Les bourgeons de membres des mutants *Xt; RAI1KI* présentent un phénotype variable. Expression du marqueur de cartilage *Sox9* dans un bourgeon de membre WT (A), *Xt/Xt* (B), *RAI1KI* (C) et *Xt/Xt; RAI1KI* (D et E) au stade embryonnaire 13.5 (E13.5). Adapté de Kherdjemil (2017).

Suite à l'analyse phénotypique des mutants multiples *Gli3* et *RAI1KI*, nous avons voulu étudier les causes moléculaires sous-jacentes à ce phénotype d'oligodactylie rencontré chez les triples mutants *Xt; RAI1KI*. La croissance du bourgeon de membre implique l'établissement d'une boucle de rétrocontrôle positive entre l'AER exprimant les *Fgfs* et le mésenchyme postérieur exprimant *Shh*. *Grem1*, le facteur moléculaire médiant la transduction du signal entre ces deux voies de signalisation, semble être un acteur important de la modulation du nombre de doigts (Zuniga, 1999 ; Khokha, 2003). En effet, plusieurs études ont suggéré que la répression des BMPs mésenchymateux médiée par *Grem1* serait la clé de la spécification des doigts II à V induite par *Shh* et de l'expansion proliférative du territoire digital (l'autopode) (Zuniga, 1999 ; Michos, 2004 ; Harfe, 2004 ; Panman, 2006 ; Zhu, 2008). De plus, l'analyse phénotypique des bourgeons de membre déficient pour *Grem1* (*Grem1*^{-/-}) présentent des membres oligodactyles et une fusion entre l'ulna et le radius (Bénazet, 2009). L'analyse moléculaire sous-jacente a permis de démontrer que la boucle de rétrocontrôle positive n'a pas été établit dans ces

bourgeons, ce qui a perturbé les deux centres signalétiques et le développement distal de l'autopode; les bourgeons présentent une diminution importante de l'expression de *Shh* et *Fgf8*. De plus, les domaines d'expression des différents gènes à identité postérieure tel que *Hoxd12*, *Hoxd13*, et *Ptch1* sont fortement diminués et restreints à la partie la plus postérieure de l'autopode (Bénazet, 2009). La régulation de l'expression de *Grem1* est contrôlée par plusieurs éléments *cis*-régulateur qui sont localisés dans le gène *Fmn1* (Zuniga, 1999 ; Zhou, 2009 ; Zuniga, 2012 ; Li, 2014a). Les mutants *limb deformity (ld)* présentent des mutations dans la région régulatrice de *Grem1* au niveau du gène *Fmn1* et un phénotype d'oligodactylie (Zuniga, 1999). De plus, il a été montré que GLI3R contrôle directement la répression de l'expression de *Grem1* dans la région antérieure de l'autopode en liant l'un des éléments régulateurs de *Grem1* localisé dans le gène *Fmn1* (Lopez-Rios, 2012 ; Li, 2014a). D'ailleurs, la double inactivation de *Gli3* (mutant *Xt*) et *formin* (mutant *ld*) induit aussi un phénotype d'oligodactylie (Zuniga, 1999). L'analyse phénotypique du squelette de ces mutants a démontré une perte d'identité des différents doigts, ainsi qu'une réduction de la taille des éléments squelettiques proximaux (stylopode et zeugopode) (Zuniga, 1999). De plus, les bourgeons de membres polydactyles des mutants perte-de-fonction pour *Gli3* et des mutants *5'HoxD* présentent un gain antérieur du domaine d'expression de *Grem1* (Lopez-Rios, 2012 ; Sheth, 2013). Finalement, il a été démontré que les gènes *Hox13* contrôlent directement l'expression de *Grem1* (Sheth, 2013). Pour ces raisons, nous avons formulé l'hypothèse que l'oligodactylie du mutant *Xt; RAI1KI* pourrait être une conséquence d'une diminution de l'expression de *Grem1*. Nous avons donc effectué des expériences d'hybridation *in situ* pour le gène *Grem1* chez les embryons mutants multiples *Gli3* et *RAI1KI*. Nous pouvons observer que les embryons mutants hétérozygotes pour le gène *Gli3* (*Xt/+*) présentent un domaine d'expression de *Grem1* très semblable à l'expression de ce gène chez les embryons de types sauvages (Figure 3.2 F, G). Cependant, chez le simple mutant *Xt/Xt* et le double mutant *RAI1KI*, nous pouvons observer une expansion antérieure du domaine d'expression de *Grem1* (Figure 3.2 H à K). Finalement, chez le triple mutant *Xt; RAI1KI*, on observe une diminution importante de l'expression de *Grem1* jusqu'à une absence presque totale de son expression ou alors, nous pouvons observer une expression ectopique dans la région antérieure de l'autopode (Figure 3.2 L, M). Ce résultat suggère que HOXA11 régule directement ou indirectement l'expression de *Grem1* lorsqu'il est exprimé ectopiquement dans le domaine distal. De plus, la variation de l'expression de *Gremlin* n'est pas très surprenante et

est potentiellement corrélée à la variation du phénotype d'oligodactylie observée chez les triples mutants, avec la formation de 3 ou 4 doigts (Figure 3.1 D, E).

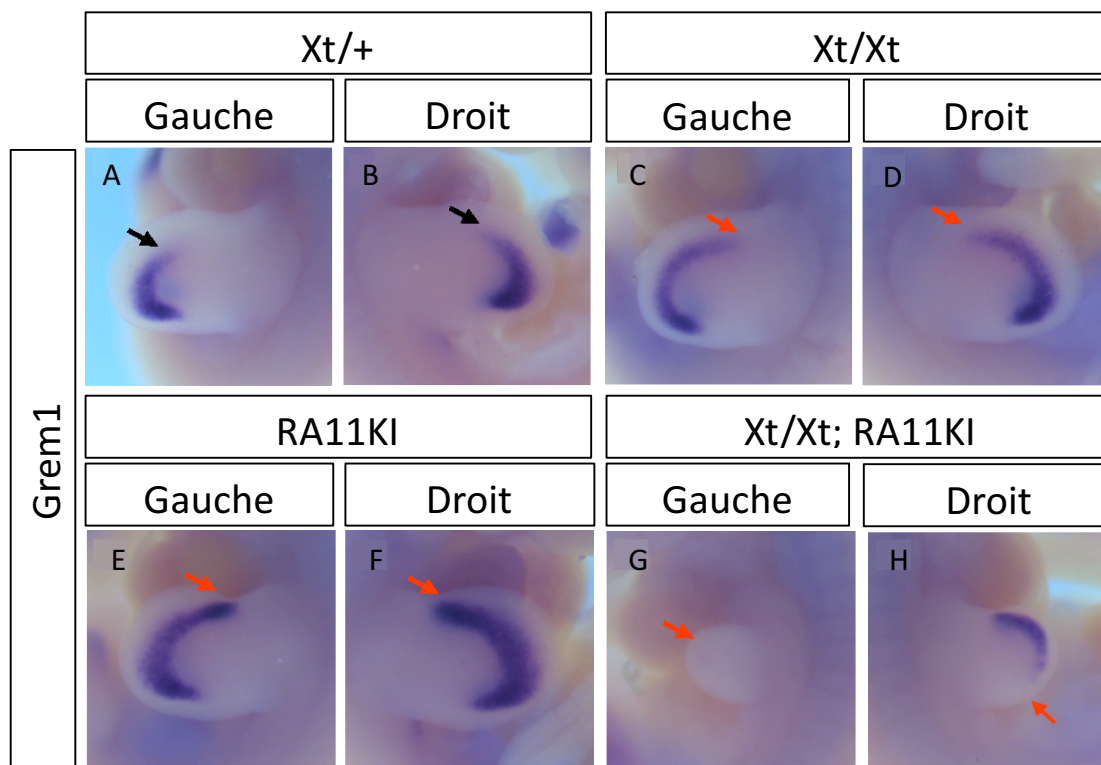


Figure 3.2 Modification du domaine d'expression de *Grem1*. Expression du gène *Grem1* dans des bourgeons de membres *Xt/+* (F et G), *Xt/Xt* (H et I), *RA11KI* (J et K) et *Xt/Xt; RA11KI* (L et M) au stade embryonnaire 11.5 (E11.5).

3.3 Analyse bio-informatique des données brut du ChIP-Seq H3K27Ac via les plateformes Galaxy et EaSeq

L'augmentation antérieure du domaine d'expression de *Grem1* chez les embryons mutants *Gli3* et *Hoxa11*, en plus de la diminution importante de l'expression de *Grem1* dans les bourgeons de membre des mutants *Xt; RA11KI*, suggèrent que l'expression de ce gène pourrait être en partie contrôlée par les facteurs de transcription HOXA11 et GLI3R. Nous avons donc décidé d'utiliser des approches génomiques afin d'évaluer l'effet du facteur de transcription (FT)

HOXA11, lorsqu'il est exprimé dans la région distale de l'autopode, sur les éléments *cis*-régulateurs de *Grem1*, mais également sur d'autres éléments régulateurs à l'échelle du génome entier. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine suivi d'un séquençage à haut débit (ChIP-Seq) pour le facteur de transcription HOXA11 ainsi que des expériences de séquençage de l'ARN (RNA-Seq) avaient été préalablement effectuées dans le laboratoire à partir de cellules extraites des bourgeons de membres d'embryons *RA11KI* et de type sauvages (WT). Ces expériences nous fournissent de l'information concernant les sites de liaisons de HOXA11 ainsi que le niveau d'expression des différents gènes de l'autopode en fonction des deux conditions.

Dans le but de comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents au phénotype d'oligodactylie chez le mutant *Xt; RA11KI*, nous avons décidé de réaliser une expérience de ChIP-Seq pour la marque H3K27Ac. Cette marque est une modification épigénétique des histones, généralement associée aux promoteurs et enhancers transcriptionnellement actifs (Creyghton, 2010). Le ChIP-Seq a été effectué à partir de cellules isolées des bourgeons de membres d'embryons à E11.5, WT et portant différentes mutations : soit le mutant perte-de-fonction pour *Gli3* (*Xt/Xt*), le gain de fonction distale de *Hoxa11* (*RA11KI*) et le mutant *Xt; RA11KI*. L'analyse bio-informatique des données brutes obtenues après le séquençage peut être divisée en quelques étapes distinctes : l'évaluation de la qualité du séquençage, l'alignement des lectures (« reads ») à un génome de référence, l'appel des pics et une analyse comparative en aval correspondant à la co-localisation des pics entre les différents mutants. Cette analyse bio-informatique des données brutes a été effectuée à l'aide de la plateforme en ligne Galaxy, permettant d'effectuer les analyses de contrôle de la qualité, de rognage des séquences (« trimming »), de l'alignement des séquences (« mapping ») ainsi que l'appel des pics (« peak calling ») (Zhang, 2008 ; Langmead, 2009 ; Feng, 2012 ; Ewel, 2016). Par la suite, l'annotation des pics, la force de corrélation et la co-localisation des pics entre les différents échantillons ont été analysés à l'aide de la plateforme EaSeq (Lerdrup, 2016).

3.3.1 Analyse du contrôle de la qualité

La première étape d'une analyse bio-informatique de données brut de ChIP-Seq est de vérifier la qualité du séquençage. En effet, les données brutes produites par les plateformes de séquençage peuvent être compromises par des artefacts tel que les « indel » (insertion/délétion), les erreurs d'appel de base (« base calling error »), la contamination par le séquençage des adaptateurs ou simplement des « reads » de mauvaises qualités (Dai, 2010). J'ai alors effectué l'évaluation de la qualité des « reads » obtenus après le séquençage à haut débit avec la plateforme Galaxy. L'outil « FastQC Read Quality Report » permet l'importation des données sous format Fastqsanger ainsi qu'un aperçu rapide des problèmes potentiels de la qualité des séquences via la génération de tableaux et graphiques récapitulatifs (Blankenberg, 2010).

La commande FastQC a été effectuée sur chaque ensemble de lecture et la figure 3.3 présente un résumé de l'évaluation de la qualité des séquences générées avec la commande « MultiQC », qui permet de fournir dans un seul rapport l'évaluation de la qualité de chaque ensemble de lecture (Ewel, 2016). La qualité du séquençage est évaluée sur une échelle de 1 à 40, divisée en trois zones : les zones verte, orange et rouge correspondant respectivement à une bonne, moyenne ou pauvre qualité du séquençage. Nous pouvons d'ailleurs apprécier la qualité des différents ensembles de lecture à la figure 3.3 A, où nous pouvons observer que les séquences de chacun des ensembles de lecture se situe dans la zone verte, indiquant une bonne qualité générale des séquences. En effet, la qualité du séquençage se détériore à mesure que le séquençage continue, il n'est alors pas rare de voir des appels de base se retrouver dans la zone orange vers la fin des séquences. La commande FastQC produit également un graphique récapitulatif de la qualité par séquence, ce qui permet de déterminer s'il y a de la contamination issue du séquençage ou si une partie des séquences possède une note de qualité universellement faible. L'absence d'un pic supplémentaire en amont du pic de la qualité moyenne, permet de conclure que les séquences n'ont pas, à priori, de contamination provenant du séquençage à haut débit (Figure 3.3 B). La commande FastQC permet aussi de déterminer le contenu en GC des séquences (Figure 3.3 C) où le pic central correspond au contenu global en GC. Il est important d'évaluer le contenu en GC puisque selon la plateforme de séquençage il existe des biais qui leur sont intrinsèques. Par exemple, l'Illumina, utilisé par GénomeQc pour effectuer notre

séquençage, induit d'avantages d'erreurs sur les nucléotides G et C. Ce taux d'erreurs augmente également en fonction de la longueur des « reads » (Suzuki, 2011). La figure 3.3. C démontre que le contenu réel en GC des échantillons (en vert) présente une distribution normale, tandis que les échantillons contrôles (« inputs ») (en jaune) présentent une distribution normale mais légèrement décalée vers un pourcentage en GC plus faible. Par la suite, il est nécessaire de vérifier la quantité de base qui n'ont pas pu être séquencées et qui sont remplacées par la lettre « N », la figure 3.3 D permet de montrer que toutes les bases des séquences de chaque échantillon ont été séquencées avec succès. Un autre graphique permet de déterminer si les adaptateurs utilisés lors du séquençage ont eux-mêmes été séquencés. Il est important d'effectuer une étape de rognage (« trimming ») afin d'éliminer les adaptateurs le cas échéant (Bolger, 2014). Dans notre cas, les adaptateurs n'ont pas été séquencés et la qualité des séquences est excellente, il est alors inutile d'effectuer une étape de rognage des séquences avant la suite de l'analyse (Figure 3. S1).

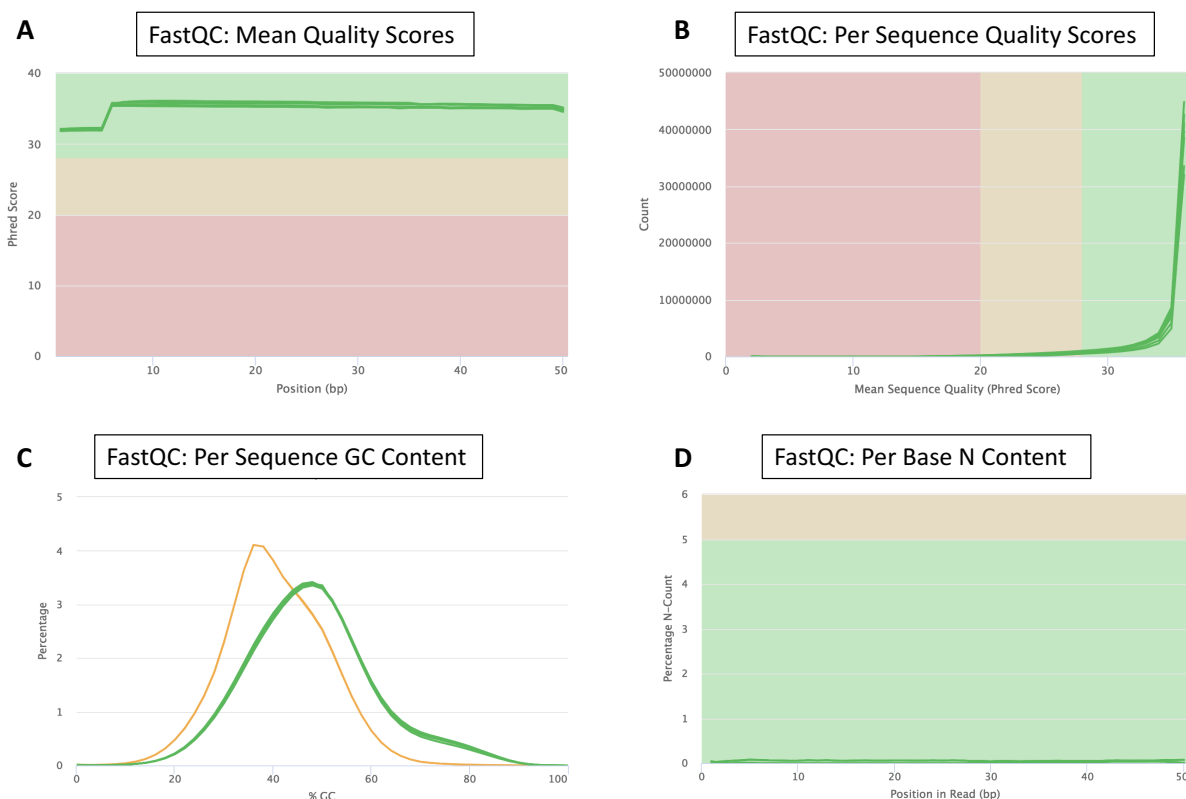


Figure 3.3 Analyse de la qualité des échantillons en provenance de l'expérience de ChIP-Seq effectuée pour la marque de modification épigénétique H3K27Ac. Captures d'écrans de « Galaxy – MultiQC » des histogrammes représentant la moyenne de la qualité des échantillons (A), de la qualité par séquence (B), du contenu en GC par séquence (C) et de la quantité de base contenant la lettre « N » dans les échantillons (D). Le code de couleur (vert, orange et rouge) indique le niveau de qualité des échantillons, avec la couleur verte représentant une qualité optimale, orange une qualité raisonnable et rouge une faible qualité des échantillons. Une analyse bio-informatique de qualité nécessite d'avoir le maximum de donnée situées dans la catégorie verte.

3.3.2 Alignement des séquences et appel des pics

Suite à l'évaluation de la qualité des échantillons, il est nécessaire d'effectuer l'alignement de ces séquences avec un génome de référence. Dans notre cas, travaillant chez la souris, nous avons aligné les séquences sur la version du génome la plus récente : mm10. La plateforme Galaxy offre plusieurs outils afin d'aligner les séquences sur un génome de référence, dépendamment de la longueur des « reads ». En effet, l'outil BWA permet d'aligner

efficacement, mais lentement, de petites séquences d'environ 50 à 100 pb, tandis que l'outil Bowtie2 permet d'aligner des séquences bien plus longues, pouvant atteindre 1000 pb (Li, 2009 ; Langmead, 2012 ; Keel, 2018). Lors de la fragmentation de l'ADN par sonication, nous avons sélectionné les fragments dont la longueur moyenne se situaient entre 100 et 600 pb, de ce fait, Bowtie2 a été sélectionné pour produire l'alignement des séquences, puisqu'il permet d'aligner de plus longues séquences d'ADN (Langmead, 2012 ; Keel, 2018). L'outil Bowtie2 génère non seulement un fichier de type BAM (« Binary sAM ») qui sera utilisé pour la suite de l'analyse, mais il donne aussi de l'information concernant le nombre de séquences qui ne se sont pas alignées, qui se sont alignées une seule fois ou plus d'une fois (Figure 3.4 A). Il est important d'avoir le plus haut pourcentage de séquences qui se sont alignées une seule fois au génome puisque ce sont les seules qui sont conservées pour la suite de l'analyse. De plus, si le pourcentage de « reads » qui ne se sont pas alignés sur le génome est élevé, cela suggère une contamination de l'échantillon par un autre génome (Langmead, 2012).

Suite à l'alignement des séquences sur le génome, il est important d'évaluer le niveau de duplication des séquences puisque nous devons éviter ces « reads » dupliqués pour la suite de l'analyse. Les séquences dupliquées sont définies comme provenant d'un seul fragment d'ADN ayant la même orientation et les mêmes coordonnées en position 5' de la séquence, ces séquences dupliquées peuvent être générées lors de la construction de la banque par PCR. Les séquences dupliquées peuvent aussi être des duplications optiques produites par le séquenceur Illumina, qui va considérer un « cluster » sur une même tuile, comme étant deux tuiles différentes. L'outil « MarkDuplicates » de Picard, disponible sur la plateforme en ligne Galaxy, permet ainsi d'éliminer ces deux sortes de séquences dupliquées, afin d'obtenir des « reads » uniques suite à l'alignement des séquences. La figure 3.4 B démontre que très peu de séquences sont dupliquées dans nos échantillons, mais malgré ce faible niveau de séquences dupliquées, une étape de déduplication a été effectuée sur chacun des échantillons avec l'outil « MarkDuplicates » disponible sur Galaxy. Cette étape a été effectuée afin d'optimiser le contrôle de la qualité des séquences utilisées pour la suite de l'analyse bio-informatique. Au final, nous obtenons des échantillons avec plus de 90% de lectures uniques (Figure 3.4 C), ce qui nous a permis de poursuivre le traitement des données de ChIP-Seq.

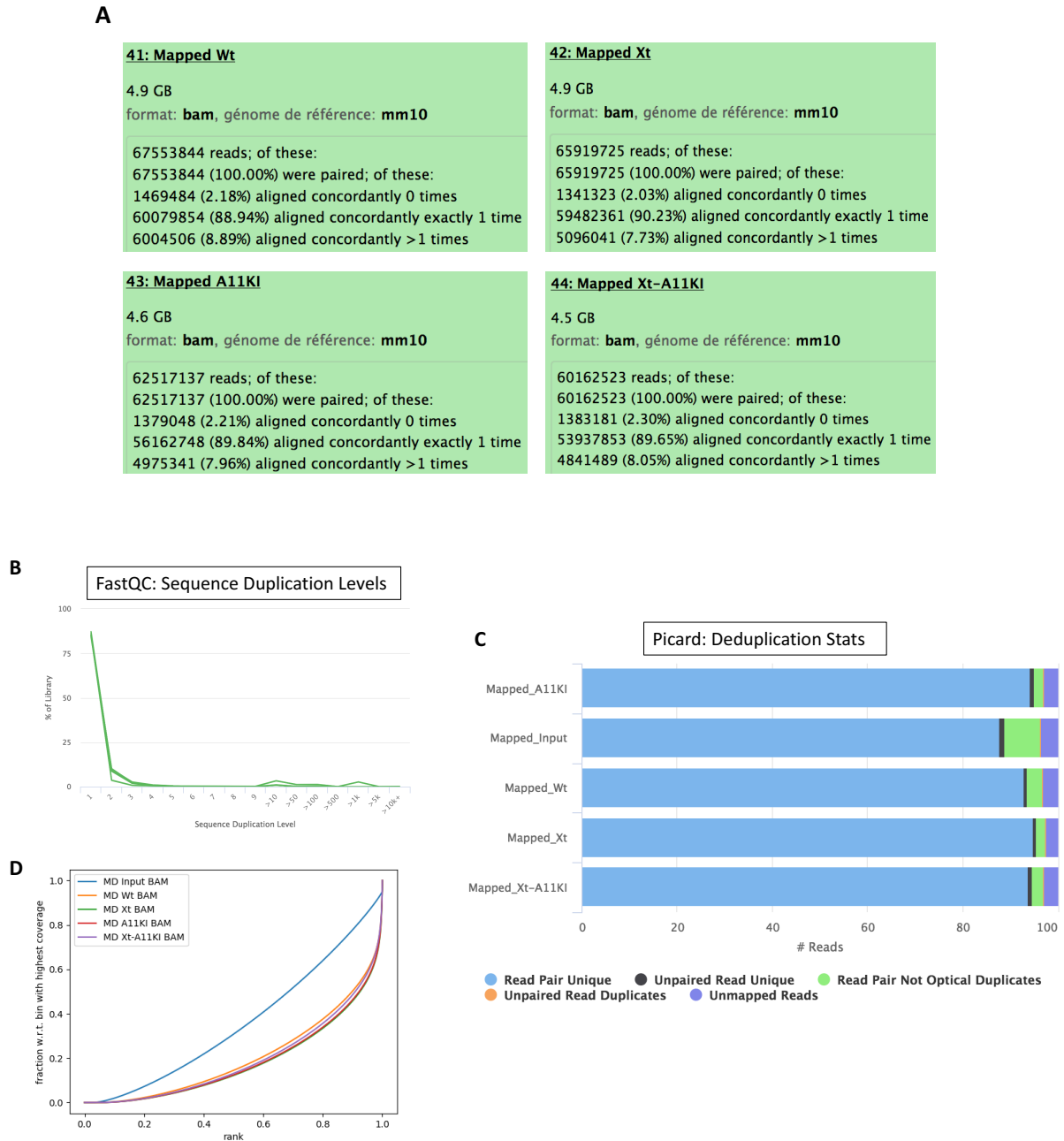


Figure 3.4 Alignement et déduplication des échantillons. Captures d'écrans de « Galaxy – Bowtie2 » des résultats de l'alignement des séquences sur le génome de référence (mm10) pour les génotypes Wt, Xt/Xt, RA11KI et Xt; RA11KI (A). Capture d'écran de « Galaxy – MultiQC » du niveau de duplication des séquences avant la déduplication (B) et après la déduplication effectuée par l'outil « MarkDuplicate » (C). Capture d'écran du graphique effectué par l'outil « Galaxy – plotFingerprint » représentant la force de l'expérience de ChIP-Seq (D).

Par la suite, nous avons utilisé les fichiers BAM dont les doublons ont été retirés afin d'évaluer la force de l'expérience de ChIP-Seq dans le but de savoir à quel point le signal d'enrichissement des différentes conditions peut être séparé du bruit de fond et être considéré fiable. Pour ce faire, nous avons utilisé l'outil « plotFingerprint » disponible sur la plateforme Galaxy (Ramirez, 2016). Cette analyse a permis de confirmer la fiabilité de l'expérience effectuée, puisque l'on peut clairement dissocier le signal des différents échantillons du signal du bruit de fond (Figure 3.4 D).

L'étape principale suivant l'alignement des séquences est l'appel des pics (« Peak calling ») à partir des fichiers BAM dont les doublons ont été retirés. L'appel des pics peut se faire sur la plateforme Galaxy avec l'outil « MACS2 Call Peak » (Zhang, 2008; Feng, 2012). MACS2 permet d'identifier les sites de liaisons enrichis dans les expériences de ChIP-Seq en comparant les signaux des différentes conditions données avec les signaux provenant de l'échantillon contrôle (« Input »). De ce fait, MACS2 capture l'influence de la complexité du génome afin d'évaluer l'importance des régions enrichies (Zhang, 2008 ; Feng, 2012). L'outil MACS2 génère un fichier de type BED (« Binary sAM ») qui sera utilisé pour les analyses subséquentes avec EaSeq : annotation des pics, corrélation entre les échantillons et co-localisation des pics selon les différents mutants (Lerdrup, 2016).

3.3.3 Annotation, corrélation et co-localisation

Les fichiers BED produit par MACS2 peuvent ensuite être exportés de Galaxy afin de les importer sur la plateforme interactive EaSeq. Cette plateforme d'analyse des données bio-informatiques permet d'effectuer l'annotation des pics sur le génome avec l'outil « Annotate » (Lerdrup, 2016). Précisément, l'annotation des pics consiste à déterminer si chaque pic est localisé dans un intron, dans un exon ou au niveau du TSS (« Transcription Start Site ») vis-à-vis des différents gènes. Suite à cette étape d'annotation, j'ai classé les gènes annotés en fonction de la valeur de leur p-value, avec une p-value supérieure à 10^{-20} , dans le but d'effectuer une analyse de corrélation entre les différents ChIP afin de déterminer s'ils sont comparables (Lerdrup, 2016). Dans notre cas, les listes de gènes enrichis dans notre expérience sont extrêmement longues, il est donc primordial d'utiliser une p-value très stringente afin de réduire

la longueur des listes de gènes et de retirer les enrichissements non significatifs. L'outil « Correlate » disponible sur la plateforme EaSeq permet d'effectuer cette analyse. La corrélation entre chacun des échantillons présente un coefficient de corrélation linéaire (r) très près de 1, valeur optimale souhaitée (Figure 3.5 A-F). En effet, l'analyse de corrélation entre des échantillons permet de vérifier si un lien existe entre deux variables et, s'il existe, de quantifier la force du lien. Ces résultats de corrélation permettent de confirmer la fiabilité des liens entre les différents échantillons analysés (Figure 3.5). Finalement, j'ai effectué une analyse comparative de co-localisation des pics annotés afin de déterminer la proportion de pics qui se retrouve dans l'une ou l'autre des différentes conditions (pics spécifiques) ainsi que la proportion de pics communs entre ces deux mêmes conditions. L'outil « Coloc » disponible sur la plateforme EaSeq permet de produire cette analyse, en utilisant la région centrale de chaque pic comme point de comparaison entre les conditions afin de déterminer s'ils co-localisent ou s'ils sont spécifiques à une condition (Lerdrup, 2016). Cette analyse comparative a mis en évidence que la majorité des pics sont communs entre les différentes conditions, alors que seulement 10 à 20% des pics peuvent être spécifiques à l'une ou l'autre des conditions comparées. De ces 10 à 20%, nous pouvons remarquer que les valeurs plus près de 20% correspondent à la comparaison entre la condition sauvage et les conditions mutantes (Figure 3.5 G-I), tandis que la comparaison entre les différents mutants semble plus près du 10-15% de pics spécifiques à chacune des conditions (Figure 3.5 J-L).

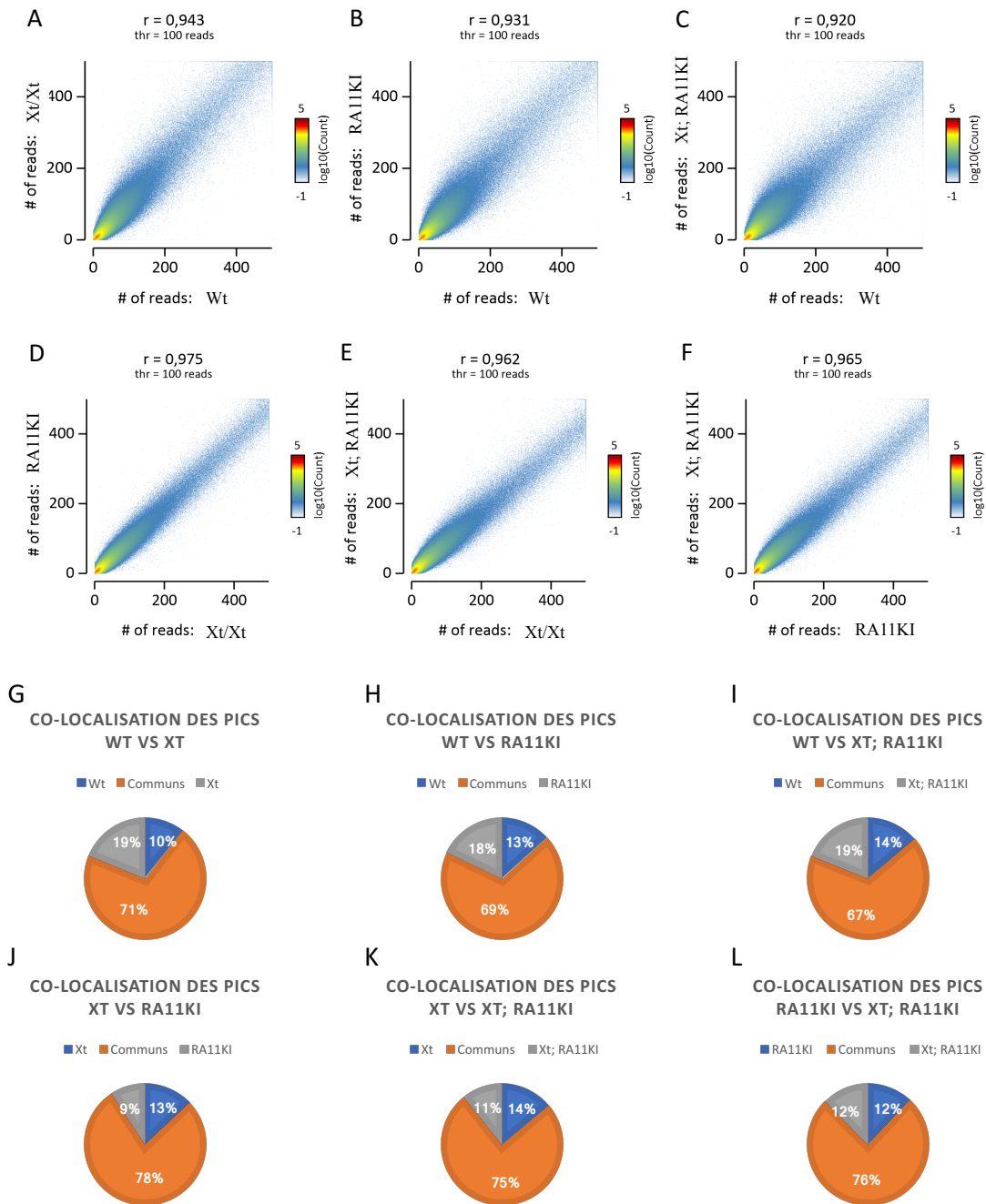


Figure 3.5 Analyses effectuées avec la plateforme interactive EaSeq. Captures d'écrans pour l'analyse de la corrélation entre les différents échantillons : Wt vs Xt/Xt (A), Wt vs RA11KI (B), Wt vs $Xt; RA11KI$ (C), Xt/Xt vs RA11KI (D), Xt/Xt vs $Xt; RA11KI$ (E) et $Xt; RA11KI$ vs RA11KI (F). Analyse comparative par co-localisation des pics spécifiques et communs entre les différents échantillons : Wt vs Xt (G), Wt vs RA11KI (H), Wt vs $Xt; RA11KI$ (I), Xt vs RA11KI (J), Xt vs $Xt; RA11KI$ (K) et RA11KI vs $Xt; RA11KI$ (L).

Ces résultats concernant le contrôle de la qualité du séquençage et les analyses subséquentes, aligner, retirer les séquences dupliquées, évaluer la force de l'expérience, annoter, etc. permettent de générer des données que l'on peut ensuite utiliser avec différents outils de visualisation, tel que USCS (« University of California Santa Cruz Genome Browser ») ou IGV (« Integrative Genomics Viewer »). Pour ce faire, il suffit de convertir les formats BAM obtenus après alignement et retrait des doublons, en format Bigwig, conversion simple qui est possible avec la plateforme Galaxy via l'outil « BamCompare ». Spécifiquement, cet outil compare et normalise les fichiers BAM des différents échantillons au fichier BAM de l'échantillon contrôle et ce, en fonction du nombre total de « reads » (Ramirez, 2016).

3.4 *Hoxa11* exprimé dans la région distale semble contrôler l'expression de *Grem1* dans les bourgeons de membre de souris

De nombreuses études portant sur les causes moléculaires sous-jacentes aux différents phénotypes de polydactylie ou d'oligodactylie ont démontré que ces bourgeons de membres présentaient souvent une altération du domaine d'expression de *Grem1*. En effet, les embryons de souris qui ont une perte-de-fonction pour le gène *Gli3*, une réduction du dosage des gènes *5'HoxD* et *Hoxa13*, un gain-de-fonction pour *Hoxa11* ou encore une diminution de l'activité des BMPs présentent tous des membres polydactyles avec une expansion antérieure du domaine d'expression de *Grem1* (Masuya, 1995 ; Büscher, 1997 ; Sheth, 2007 ; Lopez-Rios, 2012 ; Sheth, 2013). Par ailleurs, les embryons de souris mutants pour le gène *Grem1*, le locus *ld* (mutations des régions *cis*-régulatrices de *Grem1*) ou encore le double mutant *Xt/Xt; ld/ld* présentent tous des membres oligodactyles caractérisés par une réduction importante de l'expression de *Grem1* (Zuniga, 1999 ; Bénazet, 2009 ; Zhou, 2009;). De plus, il a déjà été démontré que les facteurs de transcription HOX13 ainsi que GLI3R contrôlent directement l'expression de *Grem1* en se liant à certains éléments *cis*-régulateurs contrôlant son expression (Zuniga, 2012 ; Sheth, 2013 ; Li, 2014). Pour ces raisons, nous avons proposé l'hypothèse que *Hoxa11* pourrait contrôler l'expression de *Grem1* lorsqu'il est exprimé dans la région distale de l'autopode, ce qui a été confirmé par hybridation *in situ*. Cependant, on ne retrouve aucune différence significative au niveau de l'enrichissement de la marque H3K27Ac au niveau du promoteur de *Grem1* (Figure

3.6A). Ce résultat n'est pas très surprenant puisqu'il a été montré que la variation du domaine d'expression de *Grem1* dans différents mutants, tel que les mutants *ld/ld*, est induite par des mutations affectant la région régulatrice de *Grem1* plutôt que son gène directement (Zuniga, 2004). En effet, plusieurs régions régulatrices ont été identifiées dans le locus du gène *Fmn1*. Dans un bourgeon de membre sauvage, les régions GBR1 et 2 sont nécessaires pour induire l'activation de *Grem1* au niveau du mésenchyme postérieur (Zuniga, 2012). Nous pouvons d'ailleurs observer la liaison par le facteur HOXA11 autant dans le type sauvage (expression proximale de *Hoxa11*) que dans le mutant gain-de-fonction HOXA11 (expression distale de *Hoxa11*) ainsi que de la liaison par les facteurs HOX13 qui sont nécessaires pour induire l'activation initiale de *Grem1* (Figure 3.6 B) (Sheth, 2013). L'activité de l'élément régulateur GBR4/GRE1 est nécessaire, quant à lui, pour bloquer l'expression de *Gremlin* dans le mésenchyme antérieur de l'autopode par la liaison de GLI3 sous sa forme répressive (GLI3R) (Li, 2014 ; Zuniga, 2012). De plus, il a été montré que toute la région GRS1 est nécessaire afin de permettre l'expansion antéro-distale subséquente de l'expression de *Grem1* (Zuniga, 2012). Il a préalablement été démontré que les fonctions des gènes des complexes *HoxA* et *HoxD* sont nécessaires pour l'expression de *Grem1* (Sheth, 2013). Les expériences de ChIP-Seq effectuées pour les facteurs de transcription HOXA11, HOXA13 et HOXD13 dans le type sauvage, démontrent que ces facteurs lient chacun des éléments identifiés comme importants pour la régulation de *Gremlin* (Figure 3.6 B). Nous pouvons remarquer un niveau d'enrichissement similaire pour la marque H3K27Ac entre les mutants *Xt/Xt*, *RA11KI* et le type sauvage pour les FTs de la famille des gènes *Hox* (Figure 3.6 B). Ainsi la diminution observée chez le triple mutant au niveau du GRS1 suggère une diminution potentielle de l'activation de l'enhancer GRS1. Finalement, nous pouvons observer que lorsque *Hoxa11* est exprimé dans la région distale de l'autopode il est également capable de lier tous ces éléments *cis*-régulateurs (Figure 3.6 B). Les liaisons de HOXA11 au niveau des éléments régulateurs de *Gremlin1* suggèrent que ce facteur participe à la régulation de l'expression de *Gremlin1* dans les bourgeons de membres de souris et ce, dans un contexte gain-de-fonction pour *Hoxa11*.

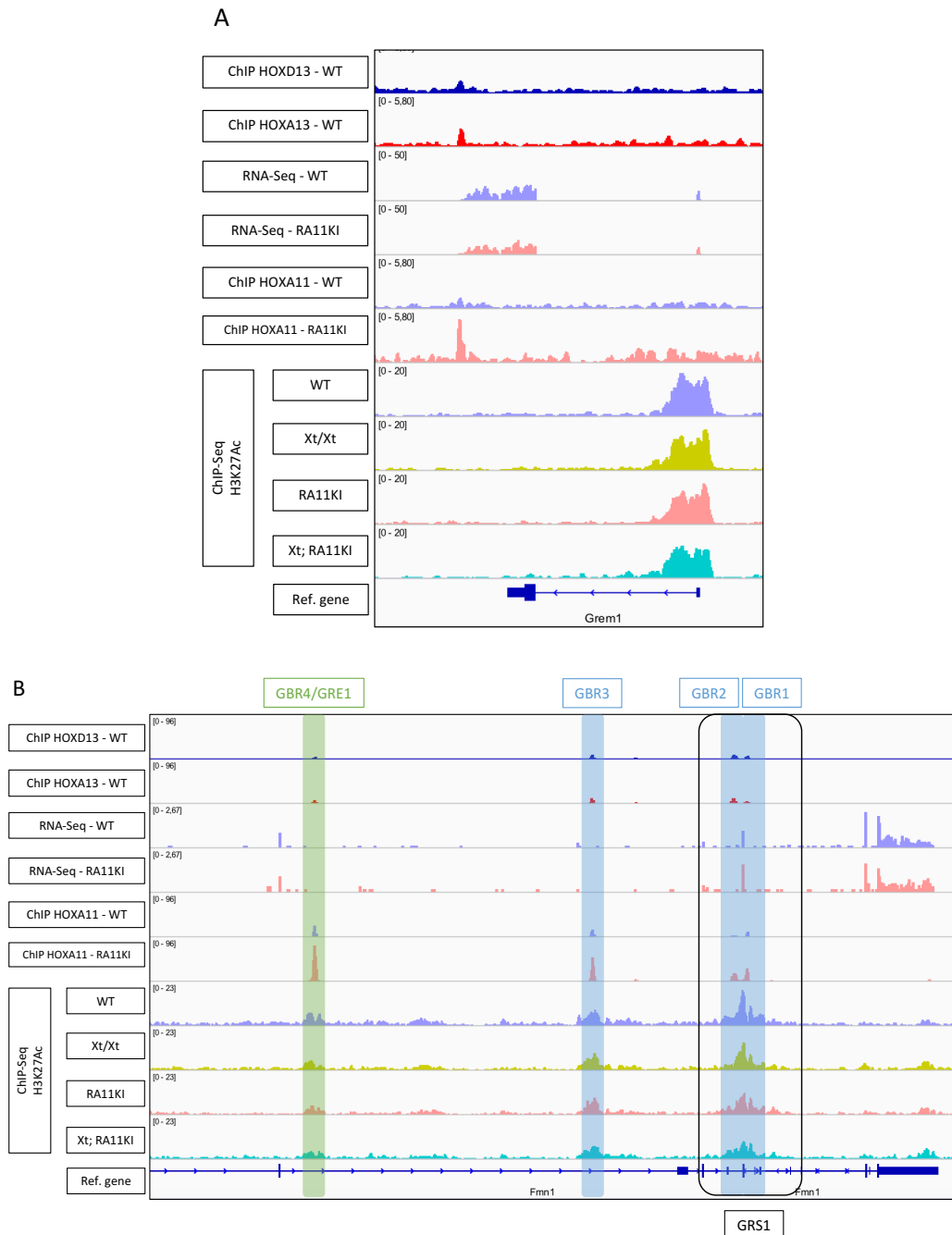


Figure 3.6 La liaison du facteur de transcription HOXA11 sur les éléments *cis*-régulateurs de *Grem1* suggère que *Hoxa11* régule directement son expression dans un contexte gain-de-fonction pour *Hoxa11*. Capture d'écran « Integrative Genomics Viewer » du gène *Grem1* (A) et du gène *Fmn1* (régions régulatrices de *Grem1*) (B). Noter la liaison de HOXA11 (Wt et RA11KI) au niveau des régions régulatrices identifiées (GBR 1 à 4), ainsi que l'enrichissement de la marque H3K27Ac au niveau de l'élément *cis*-régulateur GRS1.

3.5 L'oligodactylie du triple mutant *Xt; Prx1Cre; RA11KI* semble être associée à une exacerbation de la perte de l'identité antérieure observée chez le mutant RA11KI

L'analyse du transcriptome des bourgeons de membre des mutants gain-de-fonction pour *Hoxa11*, a montré que la polydactylie est associée à une perte de l'identité antérieure de l'autopode. En effet, une expérience de séquençage à haut débit des ARNs (RNA-Seq) a permis de démontrer une diminution de l'expression de certains gènes spécifiques à l'identité antérieure de l'autopode, tels que les gènes *Irx3/5* (*Iroquois 3 et 5*), *Lhx9* (« *LIM Homeobox 9* »), *Pax9* (*Paired box 9*) et *Alx4* (« *Aristaless-Like Homeobox 4* ») (Figure 3.7 A). De plus, il a été prouvé que la polydactylie du mutant RA11KI est aussi associée à une antériorisation des domaines d'expression des gènes spécifiques à l'identité postérieure de l'autopode, tel que *Jag1*, *Grem1*, *Hand2* et les gènes *5'HoxD* (Kherdjemil, 2017). Ces mêmes gènes dont l'expression est dérégulée chez le mutant RA11KI, sont aussi des gènes dont l'expression est modifiée lors du développement de la polydactylie chez les embryons mutants *Xt/Xt* (Peters, 1999 ; McGlinn, 2005). Nous avons donc procédé à l'analyse de ces différents gènes via l'analyse bio-informatique des ChIPs- et RNA-Seq effectués sur les différents mutants.

L'un des acteurs importants de l'identité antérieure de l'autopode est le facteur de transcription ALX4. Ce FT est exprimé dans le mésenchyme antérieur de l'autopode et participe à l'établissement de la polarité antéro-postérieure du bourgeon de membre (Qu, 1997 ; Qu, 1998 ; Zuniga, 1999 ; Kuijper, 2005 ; Panman, 2005). Le domaine d'expression du gène *Alx4* dans la région antérieure est divisé en deux domaines, un domaine proximal et un domaine distal dépendant de GLI3R (te Welscher, 2002 ; Kuijper, 2005). En effet, dans les embryons perte-de-fonction pour *Gli3*, les bourgeons de membre présentent une perte de l'expression antéro-distale d'*Alx4* (Kuijper, 2005 ; Panman, 2005). De plus, la polydactylie du mutant *Xt/Xt* dépend de la fonction d'*Alx4* puisque le simple mutant homozygote *Xt* présente un autopode polydactyle constitué en moyenne de 6 à 8 doigts, tandis que l'inactivation double de *Gli3* et *Alx4* induit le développement d'un membre polydactyle composé de 6 doigts (Panman, 2005 ; Kuijper, 2005). Finalement, l'inactivation du gène *Alx4* induit le développement d'un membre polydactyle avec

une duplication du doigt le plus antérieur, le doigt I (Takahashi, 1998). Par ailleurs, *Alx4* est impliqué dans le phénotype de polydactylie des mutants *Strong's Luxoid (Lst)* (Masuya, 1995 ; Büscher, 1997 ; Qu, 1997 ; Qu, 1998). En effet, il a été démontré que la polydactylie des mutants *Lst* est induite par une mutation perte-de-fonction du gène *Alx4* (Qu, 1998). La perte-de-fonction du gène *Alx4* conduit à une expression ectopique antérieure de *Shh* (Masuya, 1995 ; Qu, 1997 ; Qu, 1998). L'analyse du profil épigénétique du mutant *Xt; RAI1KI* présente une perte importante de l'enrichissement de la marque H3K27Ac au niveau du promoteur du gène *Alx4*, suggérant une diminution du niveau d'expression de ce gène chez les souris oligodactyles (Figure 3.7 B, en jaune). De plus, l'expression du gène *Alx4* dans les bourgeons de membre est régulé via quatre éléments *cis*-régulateurs localisés en amont du gène (Kuijper, 2005). Ces éléments régulateurs sont liés par les facteurs de transcription HOXD13, HOXA13 et HOXA11 autant chez les embryons de type sauvage que chez les embryons gain-de-fonction *Hoxa11* (Figure 3.7 B, en vert). La liaison du FT HOXA11 au niveau de ces éléments régulateurs d'*Alx4*, suggère que HOXA11 régule directement l'expression de ce gène dans les bourgeons de membres. Finalement, la liaison de HOXA11 exprimée dans la partie distale de l'autopode, sur les régions régulatrices d'*Alx4*, ajoutée à la diminution apparente de la marque épigénétique H3K27Ac semble démontrer une régulation négative du gène *Alx4* par le facteur HOXA11 dans un contexte gain-de-fonction pour *Hoxa11*.

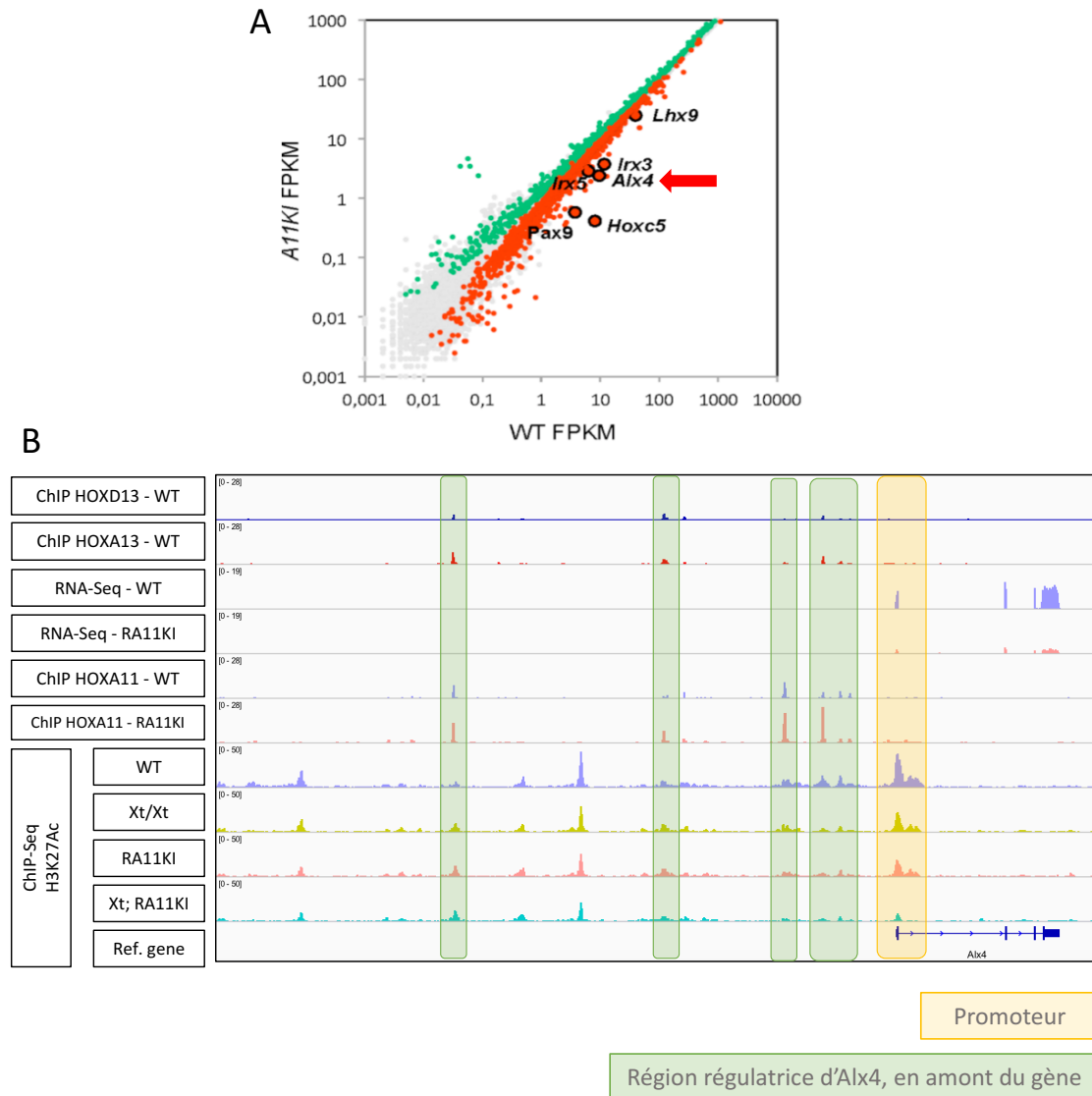


Figure 3.7 Le facteur de transcription HOXA11 semble réguler directement l'expression du gène *Alx4* dans les bourgeons de membres, dans un contexte gain-de-fonction pour *Hoxa11*. Représentation en diagramme de point de l'expression différentielle des gènes (FPKM) provenant des données de RNA-Seq effectué dans des bourgeons de membre Wt et RA11KI. Les points verts représentent les gènes dont l'expression est augmentée ($p\text{value} \leq 0,05$). Les points rouges représentent les gènes dont l'expression est diminuée ($p\text{value} \leq 0,05$). Les points gris représentent les gènes dont l'expression n'est pas modifiée ($p\text{value} \geq 0,05$) (A). Capture d'écran « Integrative Genomics Viewer » du locus *Alx4*, noter la liaison de HOXA11 au niveau des régions régulatrices d'*Alx4* (en vert en amont du gène) ainsi que le niveau d'enrichissement de la marque H3K27Ac au niveau du promoteur du gène (en jaune) (B).

Cependant, *Alx4* n'est pas le seul gène spécifique à l'identité antérieure de l'autopode. En effet, l'expression de plusieurs gènes est restreinte à la partie antérieure du bourgeon de membre, tels que *Lhx9*, *Irx3/5* ou encore *Hand1* (Fernandez-Teran, 2003 ; Li, 2014 ; Tzchori, 2014). Les gènes *Irx3/5* sont des marqueurs de l'identité antérieure de l'autopode et sont nécessaires pour le développement du doigt I (Li, 2014). L'expression de ces gènes est fortement diminuée dans les bourgeons de membre *RA11KI* (Figure 3.6 A et 3.7 A) et l'analyse du profil épigénétique du mutant *Xt; RA11KI* démontre une diminution importante de l'enrichissement de la marque H3K27Ac en comparaison avec les embryons sauvages (Figure 3.7 A). *Hand1* (« *Heart And Neural crest Derivatives expressed 1* ») est un facteur de transcription exprimé dans la partie la plus antérieure du bourgeon de membre et la sur-expression du facteur HAND1 dans des bourgeons, induit un léger phénotype de polydactylie caractérisé par une duplication du doigt II (Fernandez-Teran, 2003). Le facteur de transcription HAND1 présente aussi une diminution importante de son expression dans les bourgeons de membres polydactyles du mutant *RA11KI*, ainsi qu'une diminution relative de l'enrichissement de la marque H3K27Ac chez le mutant *Xt; RA11KI* (Figure 3.7 B). Finalement, la présence de pics d'enrichissement du facteur HOXA11 dans un contexte gain-de-fonction au niveau des promoteurs ou des éléments régulateurs de ces gènes spécifiques à l'identité antérieure, suggère que HOXA11 régule directement leur expression (Figure 3.6 B, 3.7 B et 3.8 B). De plus, ces résultats indiquent que la perte de l'identité antérieure qui caractérise le phénotype de polydactylie rencontré chez le mutant *RA11KI*, semble être exacerbée chez les embryons mutants *Xt; RA11KI* présentant un membre oligodactyle.

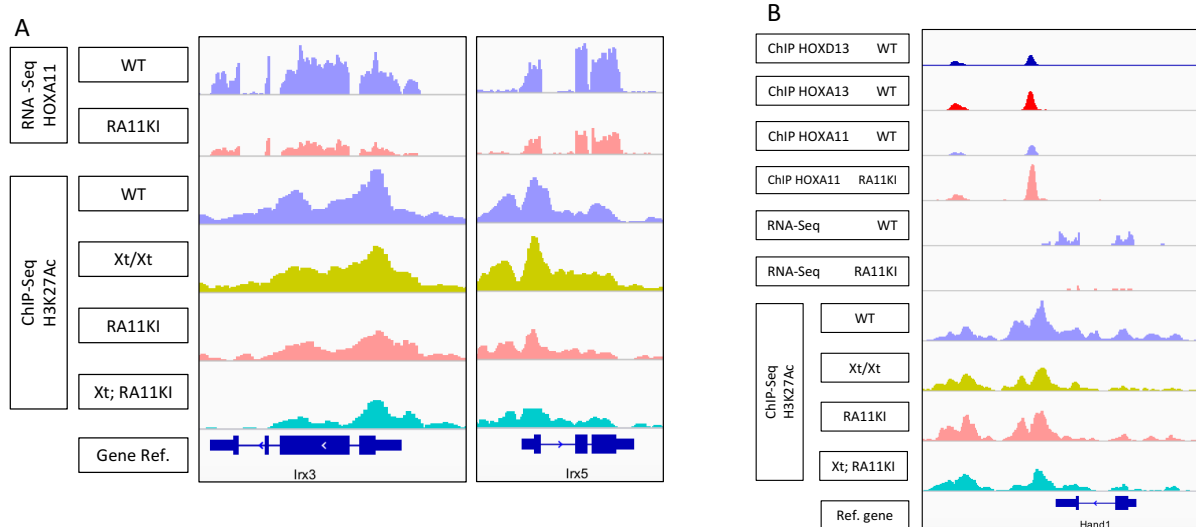


Figure 3.8 Les bourgeons de membre oligodactyle des mutants *Xt*; *RA11KI* présentent une perte de l'identité antérieur de l'autopode. Capture d'écran « Integrative Genomics Viewer » des gènes *Irx3*, *Irx5* (**A**) et *Hand1* (**B**). Noter le niveau de l'expression de ces gènes suite à l'expérience de RNA-Seq dans les bourgeons de membres Wt et RA11KI ainsi que le niveau d'enrichissement de la marque H3K27Ac au niveau de ces gènes. Noter aussi la liaison de HOXA11 au niveau de la marque H3K27Ac pour le gène *Hand1* (**B**).

Chapitre 4 : Discussion

4.1 Le développement d'un membre oligodactyle

Dans un contexte de diminution de dosage des gènes 5'*HoxD* et *Hoxa13*, *Hoxa11* est dérégulé et se retrouve exprimé de façon ectopique dans la région distale de l'autopode (Sheth, 2013). De plus, ce mutant présente un membre polydactyle, phénotype aussi retrouvé chez les embryons perte-de-fonction pour le gène *Gli3* (mutation *Xt/Xt*) (Johnson, 1967 ; Zuniga, 1999a). Les domaines d'expression des gènes *Hoxa11* et *Hoxa13* étant mutuellement exclusifs, nous avons émis l'hypothèse que la polydactylie des mutants 5'*HoxD*; *Hoxa13* soit en fait une conséquence du gain-de-fonction de *Hoxa11* dans ces embryons. La génération d'une lignée de souris par recombinaison homologe, contenant un allèle gain-de-fonction conditionnel de *Hoxa11* et la Cre recombinase sous contrôle du promoteur *Prx1*, permet d'exprimer *Hoxa11* de façon ectopique dans la partie distale de l'autopode, d'où il est généralement exclu (lignée *RA11KI*). Cette expression distale de *Hoxa11* conduit au développement d'un membre polydactyle, avec la formation de doigts surnuméraires (Kherdjemil, 2017). Les niveaux d'expression de *Hoxa13* étant très similaires entre les embryons Wt et *RA11KI*, l'expression ectopique de *Hoxa11* dans la partie distale de l'autopode, ne semble pas avoir un effet significatif sur le niveau d'expression de *Hoxa13*. De plus, la combinaison des mutations 5'*HoxD/A13* dans un fond génétique mutant pour *Gli3*, exacerbe le phénotype de polydactylie (Sheth, 2012). Cependant, nous avons démontré que la combinaison des mutations *Xt* et *RA11KI* n'induit pas le développement d'un membre polydactyle, mais induit plutôt une réduction du nombre de doigts (Kherdjemil, 2017). De plus, bien que le mutant *Xt*; *RA11KI* présente toujours un membre oligodactyle avec la formation de moins de cinq doigts, nous avons démontré que le phénotype est variable dans sa sévérité, puisque les bourgeons de membre développent parfois 3 doigts et parfois 4.

Par ailleurs, il a aussi été démontré que les gènes *Hox* distaux régulent la formation des doigts en modulant la longueur d'onde d'un mécanisme de Turing (Sheth, 2012). Ce résultat combiné à la polydactylie du mutant gain-de-fonction de *Hoxa11* et au phénotype d'oligodactylie du mutant *Xt*; *RA11KI*, suggèrent que *Hoxa11* participe également au mécanisme de réaction-diffusion de Turing. Les simulations par ordinateurs qui ont permis de générer le modèle BWS

(BMP-SOX9-WNT) ont démontré que lorsque la restriction postérieure du gène *Hoxd13* est utilisé comme paramètre pour la formation des doigts, il est possible de récapituler une série de bandes qui semble correspondre aux domaines d'expression de *Sox9* dans un bourgeon sauvage (Raspopovic, 2014). Par conséquent, dans un contexte perte-de-fonction pour *Gli3*, la réduction du dosage des gènes 5'*Hox* diminue la longueur d'onde du mécanisme de Turing, tandis que l'augmentation du dosage des gènes *Hox*, lignée *Xt; RAI1KI* où *Hoxa11* est aussi exprimé dans l'autopode, a un effet inverse, entraînant une augmentation de la longueur d'onde avec pour conséquence une diminution du nombre de doigts formés. Ces résultats suggèrent aussi un rôle pour GLI3 dans la modulation de la longueur d'onde du mécanisme de Turing, puisque le mutant gain-de-fonction de *Hoxa11* ne présente pas le même phénotype en présence et en absence de GLI3 (*RAI1KI* vs *Xt; RAI1KI*). En effet, en présence de GLI3, *Hoxa11* semble diminuer la longueur d'onde du mécanisme résultant en un membre polydactyle, tandis qu'en absence de GLI3, *Hoxa11* semble augmenter la longueur d'onde du mécanisme de réaction-diffusion. Le mécanisme de Turing semble donc être influencé non seulement par le modèle BSW, mais également par le dosage des gènes de la famille *Hox* et par *Gli3*.

4.2 La régulation de *Grem1* par *Hoxa11* dans un contexte gain-de-fonction

Suite à l'analyse phénotypique des mutants multiples, nous avons étudié les causes moléculaires sous-jacentes au phénotype d'oligodactylie présent chez les embryons mutants *Xt; RAI1KI*. La croissance du bourgeon de membre implique l'établissement de la boucle de rétrocontrôle positive entre le mésenchyme de la ZPA et l'épithélium de l'AER. Il a été démontré que la transduction de la signalisation *Shh* vers l'AER est médiée par *Grem1*, démontrant l'importance de ce gène dans ce processus (Zuniga, 1999 ; Khokha, 2003). *Grem1* présente une expansion antérieure de son domaine d'expression dans les bourgeons de membres développant un phénotype de polydactylie. En effet, les embryons perte-de-fonction *Gli3* et les embryons gain-de-fonction *Hoxa11* présentent tous un gain antérieur du domaine d'expression de *Grem1*. Toutefois, les embryons mutants pour le gène *Grem1* ou affectant sa région régulatrice, comme les mutants *ld*, présentent, quant à eux, un bourgeon de membre oligodactyle, suggérant que la diminution de la formation des doigts serait une conséquence de la perte de l'expression de

Grem1 (Khoka, 2003 ; Michos, 2004 ; Zuniga, 2004). Ces phénotypes étant très similaires à celui observé chez notre mutant *Xt; RAI1KI*, nous avons émis l'hypothèse que l'oligodactylie était une conséquence d'une diminution de l'expression de *Grem1*. En effet, nous avons démontré que dans un contexte gain-de-fonction pour *Hoxa11* et en absence de GLI3, les bourgeons de membres oligodactyles présentent soit une diminution importante du domaine d'expression de *Grem1* avec cependant une expression ectopique antérieure à son domaine normal, soit une perte de l'expression de *Grem1*. Ce résultat suggère fortement que l'oligodactylie du mutant *Xt; RAI1KI* résulte d'une altération de la boucle de rétrocontrôle positive SHH – GREM1 – FGFs, provoquant une diminution de l'expansion proliférative des cellules progénitrices des doigts. Cependant, il est probable que la réduction du nombre de doigts chez le mutant *Xt; RAI1KI* ne soit pas la conséquence de l'altération de l'expression de *Grem1* uniquement. En effet, il a été démontré que l'oligodactylie des bovins résulte d'une altération d'un élément *cis*-régulateur de *Ptch1* (*Patched-1*), tandis que son inactivation conditionnelle dans les bourgeons de membre de souris conduit aussi à un phénotype d'oligodactylie (Lopez-Rios, 2014). De plus, la signalisation SHH permet d'induire l'activation de la transcription de son récepteur, *Ptch1*. Il est donc possible que l'oligodactylie du mutant *Xt; RAI1KI* soit aussi la conséquence d'une diminution de l'expression de *Ptch1* dans ces bourgeons de membre, dû à l'altération de la boucle de rétrocontrôle SHH – GREM1 – FGFs. Par ailleurs, il a été démontré que les FTs GLI3 et HOXA11 lient cet élément *cis*-régulateur de *Ptch1* (Kherdjemil, 2017) ; il est donc possible que HOXA11 régule différenciellement l'expression de *Ptch1* en présence et en absence de GLI3, comme cela semble être le cas pour l'expression de *Grem1*.

4.3 Activation et répression médiée par HOXA11

Nous avons démontré que HOXA11 se lie aux régions régulatrices de *Grem1*, autant chez les embryons sauvages que chez les embryons mutants où *Hoxa11* est exprimé dans la région distale du bourgeon. Par ailleurs, la perte significative de l'enrichissement de la marque H3K27Ac au niveau de l'élément régulateur GRS1 dans les bourgeons de membres oligodactyles, suggère une diminution de l'activité de cet élément régulateur, essentiel pour l'expression de *Grem1* (Zuniga, 2012). Ces résultats suggèrent ainsi que *Hoxa11* participe à la régulation de

l'expression de *Grem1* dans les bourgeons de membres chez l'embryon de souris. Cependant, l'activité de *Hoxa11* ne semble pas avoir le même effet sur l'expression de *Grem1* en présence et en absence des fonctions du gène *Gli3*. De ce fait, dans un contexte sauvage, le FT GLI3 est présent dans la partie antérieure de l'autopode sous sa forme répressive (GLI3R) et permet de réprimer l'expression de *Grem1* dans la région antérieure, suite à sa liaison à l'élément régulateur GBR4/GRE1. En effet, il a été démontré que c'est la liaison de GLI3R qui induit la répression de l'expression de *Grem1* dans cette région (Zuniga, 2012 ; Li, 2014a). Cependant, nous avons aussi démontré que dans un contexte gain-de-fonction pour *Hoxa11* (lignée *RA11KI*), le gène *Grem1* présente une expansion antérieure de son domaine d'expression et ce, malgré la présence du facteur GLI3R dans ces bourgeons de membres. De plus, il a été démontré que l'expression du gène *Gli3* ne présente aucune modification de son domaine d'expression dans les bourgeons de membres *RA11KI* (Kherdjemil, 2017). L'expansion antérieure du domaine d'expression de *Grem1* dans les bourgeons *RA11KI* insinue que malgré la présence de GLI3R dans ces bourgeons, l'expression distale de *Hoxa11* perturbe positivement l'expression de *Grem1*, suggérant une possible interaction entre les facteurs de transcription GLI3 et HOXA11. De façon intéressante, il a été démontré que dans un contexte gain-de-fonction, HOXD12 pouvait interagir physiquement avec GLI3 et changer sa fonction répressive en fonction activatrice (Chen, 2004). Il est possible que dans le contexte gain-de-fonction, HOXA11 interagisse physiquement avec GLI3R et modifie sa fonction répressive en fonction activatrice (Chen, 2004). Par ailleurs, dans le même contexte gain-de-fonction pour *Hoxa11*, mais cette fois en absence des fonctions médiées par *Gli3* (mutants *Xt; RA11KI*), les bourgeons de membres présentent une diminution, voire une perte, de l'expression de *Grem1*, suggérant un effet négatif sur la régulation de *Grem1*, en inhibant son expression. Ces résultats suggèrent que l'effet de HOXA11 sur le contrôle de l'expression de *Grem1* et la formation des doigts est modulée par l'expression de *Gli3*. En effet, en présence de GLI3, HOXA11 a un effet positif sur l'expression de *Grem1* induisant le développement de doigts surnuméraires, tandis qu'en absence de GLI3, HOXA11 a un effet négatif sur la régulation de l'expression de *Grem1* causant un phénotype d'oligodactylie. Il serait intéressant de tester cette interaction en effectuant des expériences de « pull-down » et de co-immunoprécipitation (Co-IP) à partir de cellules extraites de bourgeons de membres *RA11KI* à E11.5, en utilisant des anticorps reconnaissant spécifiquement les protéines HOXA11 et GLI3. Une autre possibilité concernant les activités

répressives et activatrices de HOXA11, serait le recrutement différentiel de co-facteurs par HOXA11, en présence et en absence de GLI3. En effet, il est possible qu'en présence de GLI3, HOXA11 recrute des co-activateurs, permettant ainsi une régulation positive de l'expression de *Grem1*, tandis qu'en absence de GLI3, le FT HOXA11 pourrait cette fois recruter des co-inhibiteurs, ce qui conduirait à une régulation négative de l'expression de *Grem1* dans ces bourgeons de membre. Il serait aussi intéressant de tester s'il y a un recrutement différentiel de co-facteurs par HOXA11 en absence ou en présence de GLI3. Pour ce faire, nous pourrions effectuer une expérience de profilage des interactomes (RIME : Rapid Immunoprecipitation Mass spectrometry of Endogenous protein) qui permet l'identification des interactions entre protéines par spectrométrie de masse ; cette expérience pourrait se faire à partir de cellules extraites de bourgeons de membre *RA11KI* et *Xt*; *RA11KI* afin d'avoir des données *in vivo* (Mohammed, 2013). Par la suite, s'il y a un recrutement différentiel de co-facteurs, nous pourrions confirmer ces liaisons par des expériences de BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation) qui permettent d'observer les interactions protéines-protéines dans différents types de cellules vivantes. Cette expérience est basée sur l'association de fragments de protéines fluorescentes liés aux composants du même complexe macromoléculaire. De plus, l'intensité du signal de fluorescence émise suite à la liaison des protéines est proportionnelle à la force de l'interaction ; un fort signal suggère une interaction directe, tandis qu'un signal plus faible suggère une interaction indirecte (Hu, 2003).

4.4 L'expression distale de *Hoxa11* conduit à une perte de l'identité antérieure

L'analyse du transcriptome des bourgeons de membres avec un gain-de-fonction de *Hoxa11* a démontré que la polydactylie de ce mutant est associée à une perte de l'identité antérieure de l'autopode. En effet, cette expérience de RNA-Seq a démontré une diminution de l'expression de plusieurs gènes spécifiques à l'identité ou le développement de la partie antérieure de l'autopode, tel que *Pax9*, *Lhx9*, *Alx4* et *Irx3/5* (Kherdjemil, 2017). La polydactylie du mutant *RA11KI* est aussi associée à une antériorisation des domaines d'expression des gènes spécifiques à l'identité postérieure tel que *Jag1*, *Grem1*, *Hand2* et les gènes 5'*HoxD* (Kherdjemil, 2017).

De plus, tous ces gènes identifiés comme dérégulés dans les bourgeons de membres *RA11KI*, se trouvent être aussi dérégulés dans les bourgeons *Xt/Xt*.

Le facteur de transcription *Alx4* est un acteur important de la région antérieure de l'autopode et participe à l'établissement de la polarité A-P (Qu, 1997 ; Qu, 1998 ; Kuijper, 2005). De plus, le domaine d'expression de ce gène se divise en deux sections : une expression proximale et un domaine plus distal dépendant de *Gli3*. En effet, il a été démontré que la perte de *Gli3* induit une perte de l'expression distale de *Alx4* alors que la polydactylie du mutant *Xt/Xt* nécessite les fonctions d'*Alx4*, étant donné que la double inactivation de *Gli3* et *Alx4* induit une diminution du nombre de doigts surnuméraires (Kuijper, 2005 ; Panman, 2005). D'ailleurs, il a été préalablement démontré que l'expression du gène *Alx4* se retrouve fortement diminué dans les bourgeons de membres *RA11KI* (Kherdjemil, 2017). Les résultats du ChIP-Seq H3K27Ac ont montré une perte importante de l'enrichissement de cette marque au niveau du promoteur du gène *Alx4* pour le mutant *Xt; RA11KI* vis-à-vis des embryons sauvages. De plus, l'expression du gène *Alx4* est régulée par des éléments *cis*-régulateurs localisés en amont de ce gène (Kuijper, 2005) ; nous avons démontré que les facteurs de transcription HOXA13, HOXD13 et HOXA11 lient chacun de ces éléments, suggérant une régulation du gène *Alx4* par ces facteurs. D'ailleurs, nous avons aussi démontré que lorsque *Hoxa11* est exprimé dans la partie distale du bourgeon, il est aussi en mesure de lier ces éléments. L'enrichissement de la liaison de HOXA11 distale au niveau des régions régulatrices, ajouté à la diminution apparente de la marque H3K27Ac au niveau du promoteur d'*Alx4*, suggèrent une régulation négative médiée par HOXA11 sur l'expression d'*Alx4*. Nous pouvons d'ailleurs apprécier un effet similaire au niveau d'autres gènes spécifiques à l'identité antérieure comme *Irx3*, *Irx5* et *Hand1*. En effet nous avons démontré que tous ces gènes présentent une perte importante de l'enrichissement de la marque H3K27Ac et l'analyse du transcriptome des bourgeons de membres *RA11KI* présente aussi une diminution importante, voir une perte de l'expression de ces gènes. De plus, la présence de pics d'enrichissement du FT HOXA11 au niveau de ces gènes suggère qu'il participe à la régulation de leur expression. Ainsi il serait intéressant de confirmer si les gènes dérégulés dans un contexte perte-de-fonction pour *Gli3* ainsi que dans un contexte gain-de-fonction pour *Hoxa11*, deux mutations qui conduisent de manière indépendante au développement d'un membre polydactyle, soient également retrouvés dans les bourgeons de membres oligodactyles. Pour cela, nous

pourrions effectuer des expériences d'hybridation *in situ* afin d'observer s'il y a une altération des domaines d'expression des gènes propres à la région antérieure ainsi qu'à la région postérieure de l'autopode. Parallèlement, de simples expériences de qPCR ou de RNA-Seq pourrions nous en apprendre davantage quant au niveau d'expression de ces différents gènes et ce, en fonction des différents mutants polydactyles et oligodactyles.

4.5 Conclusions et perspectives

Finalement, pour conclure ce mémoire, nous avons démontré que les bourgeons de membres des embryons mutants *Xt; RA11KI* présentent un phénotype d'oligodactylie, mais qui est variable dans sa sévérité avec la formation de parfois 3 doigts et parfois 4. De plus, nous avons démontré que dans ces mêmes bourgeons, l'expression du gène *Grem1* est diminuée, voir perdue, alors que les mutants *Xt/Xt* et *RA11KI* présentent une expansion antérieure du domaine d'expression de *Grem1*. Ce phénomène suggère que l'activité de HOXA11 exprimé dans la partie distale est dépendante de l'expression de *Gli3* pour la modulation du nombre de doigts. En effet, en présence de GLI3, HOXA11 distal induirait un effet positif sur l'expression de *Grem1* (lignée *RA11KI*) menant au développement de doigts surnuméraires. Cependant, en absence de GLI3, HOXA11 a un effet négatif sur l'expression de *Grem1*, qui corrèle avec une diminution du nombre de doigts en formation. L'oligodactylie du mutant *Xt; RA11KI* semble donc être associée à une perte de l'expression de *Grem1* dans ces bourgeons de membres. Ainsi, dans le but de tester la capacité activatrice ou répressive de HOXA11, il serait possible de réaliser, *in vitro*, des essais luciférases. La co-transfection de HOXA11 et GLI3R devrait nous permettre de voir si un changement d'activité de leurs cibles a lieu, en comparant avec la transfection des facteurs GLI3R et de HOXA11 individuellement. Pour la suite du projet, il serait aussi intéressant de déterminer exactement les domaines et niveau d'expression des gènes spécifiques aux régions antérieures et postérieures chez le mutant *Xt; RA11KI*, afin de vérifier si les gènes dérégulés dans les mutants polydactyles *Xt/Xt* et *RA11KI*, sont aussi dérégulés dans le mutant oligodactyle *Xt; RA11KI*. En effet, les résultats de ChIP-Seq concernant la liaison de HOXA11 ainsi que la marque de la chromatine active, H3K27Ac, suggère une modification potentielle de la régulation des gènes spécifiques à l'identité antérieure par HOXA11. Des

expériences d'hybridation *in situ* nous permettrons d'observer l'altération des domaines d'expression de ces gènes, tandis que des expériences simples de qRT-PCR ou de RNA-Seq pourrons nous en apprendre davantage quant au niveau d'expression de ces différents gènes. De plus, il est possible que dans un contexte gain-de-fonction, HOXA11 forme un complexe protéique avec GLI3R dans la région antérieure du bourgeon, ce qui modifierait son action répressive en action activatrice sur les cibles de SHH. Il serait donc intéressant de tester l'interaction entre GLI3 et HOXA11 en effectuant des expériences de « pull-down » et de co-IP à partir des bourgeons de membre *Rai1KI*, avec des anticorps reconnaissant spécifiquement les protéines HOXA11 et GLI3R. Pour conclure, ce projet de recherche a permis de caractériser certaines cibles du facteur de transcription HOXA11 lorsqu'il est ectopiquement exprimé dans l'autopode, mais également de déterminer certaines causes moléculaires sous-jacentes au phénotype d'oligodactylie présent chez les embryons mutants *Xt; Rai1KI*. Les données acquises au cours de ce projet seront ultérieurement utiles pour la compréhension des mécanismes moléculaires ayant contribué à l'acquisition et la stabilisation de l'état pentadactyle des tétrapodes au cours de l'évolution.

Bibliographie

Ahn, S. et Joyner, A.L. (2004). Dynamic changes in the response of cells to positive hedgehog signaling during mouse limb patterning. *Cell*, 118, 505-516

Bandyopadhyay, A., Tsuji, K., Cox, K., Harfe, B.D., Rosen, V. et Tabin, C.J. (2006). Genetic analysis of the roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis. *PLoS Genetics*, 2(12), 2116-2130

Bénazet, J-D. et Zeller, R. (2009). Vertebrate limb development: Moving from classical morphogen gradients to an integrated 4-dimensional patterning system. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1-14

Bénazet, J-D., Bischofberger, M., Tiecke, E., Goncalves, A., Martin, J-F., Zuniga, A., Naef, F. et Zeller, R. (2009). A self-regulatory system of interlinked signaling feedback loops controls mouse limb patterning. *Science* 323, 1050-1053

Bénazet, J-D. et Zeller, R. (2009a). Vertebrate limb development: Moving from classical morphogen gradients to an integrated 4-dimensional patterning system. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 1:a001339

Bi, W., Deng, J.M., Zhang, Z., Behringer, R.R. et de Crombrughe, B. (1999). Sox9 is required for cartilage formation. *Nature Genetics*, 22(1), 85-89

Blankenberg, D., Gordon, A., Von Kuster, G., Coraor, N., Taylor, J. et Nekrutenko, A. (2010). Manipulation of FASTQ data with Galaxy. *Bioinformatics*, 26(14), 1783-1785

Blieck, A. (2010). Origine des tetrapods, scenarios, théories erronées et événements évolutifs. *Ann. Soc. Géol. Du Nord*, T.17(2e), 37-46

Bolger, A.M., Lohse, M. et Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120

Boulet, A.M. et Capecchi, M.R. (2003). Multiple roles of Hoxa11 and Hoxd11 in the formation of the mammalian forelimb zeugopod. *Development*, 131, 299-309

Boulet, A.M., Moon, A.M., Arenkiel, B.R. et Capecchi, M.R. (2004). The roles of Fgf4 and Fgf8 in limb bud initiation and outgrowth. *Developmental Biology*, 273(2), 361-372

Bowers, M., Eng, L., Lao, Z., Turnbull, R.K., Bao, X., Riedel, E., Mackem, S. et Joyner, A.L. (2012). Limb anterior-posterior polarity integrates activator and repressor functions of GLI2 as well as GLI3. *Dev Biol.*, 370(1), 110-124

Brunet, L.J., McMahon, J.A., McMahon, A.P. et Harland, R.M. (1998). Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton. *Science*, 280, 1455-1457

- Burke, A.C., Nelson, C.E., Morgan, B.A. et Tabin, C. (1995). Hox genes and the evolution of vertebrate axial morphology. *Development*, 121, 333-346
- Büscher, D., Bosse, B., Heymer, J. et Rüther, U. (1997). Evidence for genetic control of Sonic hedgehog by Gli3 in mouse limb development. *Mechanisms of Development*, 62, 175-182
- Butterfield, N.C., Metzis, V., McGlinn, E., Bruce, S.J., Wainwright, B.J. et Wicking, C. (2009). Patched 1 is a crucial determinant of asymmetry and digit number in the vertebrate limb. *Development*, 136, 3551-3524
- Capdevila, J., Tsukui, T., Rodriguez-Esteban, C., Zappavigna, V. et Izpisua-Belmonte, J.C. (1999). Control of vertebrate limb outgrowth by the proximal factor Meis2 and distal antagonism of BMPs by Gremlin. *Molecular Cell*, 4, 839-849
- Capellini, T.D., Di Giacomo, G., Salsi, V., Brendolan, A., Ferretti, E., Srivastava, D., Zappavigna, V. and Selleri, L. (2006). Pbx1/Pbx2 requirement for distal limb patterning is mediated by hierarchical control of Hox gene spatial distribution and Shh expression. *Development*, 133, 2263-2273
- Chapman, D.L., Garvey, N., Hancock, S., Alexiou, M., Agulnik, S.I., Gibson-Brown, J.J., Cebra-Thomas, J., Bollag, R.J., Silver, L.M. et Papaioannou, V.E. (1996). Expression of the T-box family genes, *Tbx1-Tbx5*, during early mouse development. *Dev. Dyn.*, 206, 379-390
- Chen, Y., Knezevic, V., Ervin, V., Hutson, R., Ward, Y. et Mackem, S. (2004). Direct interaction with Hoxd proteins reverses Gli3-repressors function to promote digit formation downstream of Shh. *Development*, 131(10), 2339-2347
- Chiang, C., Litingtung, Y., Harris, M.P., Simandl, B.K., Li, Y., Beachy, P.A. et Fallon, J.F. (2001). Manifestation of the limb prepatter: limb development in the absence of sonic hedgehog function. *Dev. Biol.*, 236, 421-435
- Cohn, M.J., Izpisua-Belmonte, J.C., Abud, H., Heath, J.K. et Tickle, C. (1995). Fibroblast growth factors induce additional limb development from the flank of chick embryos. *Cell*, 80, 739-746
- Creyghton, M.P., Cheng, A.W., Welstead, G.G., Kooistra, T., Carey, B.W., Steine, E.J., Hanna, J., Lodato, M.A., Frampton, G.M., Sharp, P.A., Boyer, L.A., Young, R.A. et Jaenisch, R. (2010). Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *PNAS*, 107(50), 21931-21936
- Crossley, P.H., Minowada, G., MacArthur, C.A. et Martin, G.R. (1996). Roles for FGF8 in the induction, initiation, and maintenance of chick limb development. *Cell*, 84(1), 127-136
- Dahn, R.D. et Fallon, J.F. (2000). Interdigital regulation of digit identity and homeotic transformation by modulated BMP signaling. *Science*, 289, 438-441

Dai, M., Thompson, R.C., Maher, C., Contreras-Galindo, R., Kaplan, M.H., Markovitz, D.M., Omenn, G. et Meng, F. (2010). NGSQC : Cross-Platform quality analysis pipeline for deep sequencing data. *BMC Genomics*, 11(4), S7

Dai, P., Akimaru, H., Tanaka, Y., Maekawa, T., Nakafuku, M., Ishii, S. (1999). Sonic Hedgehog-induced activation of the Gli1 promoter is mediated by GLI3. *J. Biol. Chem.*, 274, 8143-8152

Davis, A.P., Witte, D.P., Hsieh-Li, H.M., Potter, S.S. et Capecchi, M.R. (1995). Absence of radius and ulna in mice lacking *hoxa-11* and *hoxd-11*. *Nature*, 375, 791-795

Dollé, P., Dierich, A., LeMeur, M., Schimmang, T., Schuhbaur, B., Chambon, P. et Duboule, D. (1993). Disruption of the *Hoxd-13* gene induces localized heterochrony leading to mice with neotenic limbs. *Cell*, 75, 431-441

Drossopoulou, G., Lewis, K.E., Sanz-Ezquerro, J.J., Nikbakht, N., MaMahon, A.P., Hofmann, C. et Tickle, C. (2000). A model for anteroposterior patterning of the vertebrate limb based on sequential long- and short-range Shh signalling and Bmp signalling. *Development*, 127, 1337-1348

Duboule, D. et Dollé, P. (1989). The structural and functional organization of the murine HOX gene family resembles that of Drosophila homeotic genes. *The EMBO Journal*, 8(5), 1497-1505

Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S. et Käller, M. (2016). MultiQC : summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*, 32(19), 3047-3048

Favier, B., Rijli, F.M., Fromental-Ramain, C., Fraulob, V., Chambon, P. et Dollé, P. (1996). Functional cooperation between the non-paralogous genes *Hoxa-10* and *Hoxd-10* in the developing forelimb and axial skeleton. *Development*, 122, 449-460

Feng, J., Liu, T., Qin, B., Zhang, Y. et Liu, X.S. (2012). Identifying ChIP-seq enrichment using MACS. *Nature Protocols*, 7, 1728-1740

Fernandez-Teran, M., Piedra, M.E., Rodriguez-Rey, J.C., Talamillo, A. et Ros, M.A. (2003). Expression and regulation of *eHAND* during limb development. *Developmental Dynamics*, 226, 690-701

Fromental-Ramain, C., Warot, X., Lakkaraju, S., Favier, B., Haack, H., Birling, C., Dierich, A., Dollé, P. et Chambon, P. (1996). Specific and redundant functions of the paralogous *Hoxa-9* and *Hoxd-9* genes in forelimb and axial skeleton patterning. *Development*, 122, 461-472

Fromental-Ramain, C., Warot, X., Messadecq, N., LeMeur, M., Dollé, P. et Chambon, P. (1996). *Hoxa-13* and *Hoxd-13* play a crucial role in the patterning of the limb autopod. *Development*, 122, 2997-3011

- Galli, A., Robay, D., Osterwalder, M., Bao, X., Benazet, J-D., Tariq, M., Paro, R., Mackem, S. et Zeller, R. (2010). Distinct roles of Hand2 in initiating polarity and posterior Shh expression during the onset of mouse limb bud development. *PLoS Genetic*, 6(4),
- Galceran, J., Farinas, I., Depew, M.J., Clevers, H. et Grosschedl, R. (1999). Wnt3a^{-/-}-like phenotype and limb deficiency in Lef1^{-/-}Tcf1^{-/-} mice. *Genes Dev.*, 13(6), 709-717
- Gaunt, S.J. (1994). Conservation in the Hox code during morphological evolution. *Int. J. Dev. Biol.*, 38, 549-552
- Geetha-Loganathan, P., Nimmagadda, S. et Scaal, M. (2008). Wnt signaling in limb organogenesis. *Organogenesis*, 4(2), 109-115
- Gibson-Brown, J.J., Agulnik, S.I., Chapman, D.L., Alexiou, M., Garvey, N., Silver, L.M. et Papaioannou, V.E. (1996). Evidence of a role for T-box genes in the evolution of limb morphogenesis and the specification of forelimb/hindlimb identity. *Mech. Of Dev*, 56, 93-101
- Graham, A., Papalopulu, N. et Krumlauf, R. (1989). The murine and Drosophila homeobox gene complexes have common features of organization and expression. *Cell*, 57, 367-378
- Goodman, F.R. (2003). Congenital abnormalities of body patterning: embryology revisited. *The Lancet*, 362(9384), 651-662
- Haramis, A.G., Brown, J.M. et Zeller, R. (1995). The limb deformity mutation disrupts the SHH/FGF-4 feedback loop and regulation of 5'HoxD genes during limb pattern formation. *Development*, 121, 4237-4245
- Harfe, B.D., Scherz, P.J., Nissim, S., Tian, H., McMahon, A.P. et Tabin, C.J. (2004). Evidence for an expansion-based temporal Shh gradient in specifying vertebrate digit identities. *Cell*, 118(4), 517-528
- Hill, T.P., Später, D., Taketo, M.M., Birchmeier, W. et Hartmann, C. (2005). Canonical Wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. *Developmental Cell*, 8(5), 727-738
- Hu, C-D. et Kerrpola, T.M. (2003). Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells eusing multicolor fluorescence complementation analysis. *Nat. Biotechnol.*, 21(5), 539-545
- Huang, B-L., Trofka, A., Furusawa, A., Norrie, J.L., Rabinowitz, A.H., Vokes, S.A., Taketo, M.M., Zakany, J. et Mackem, S. (2016). An interdigit signaling centre instructs coordinate phalanx-joint formation governed by 5'Hoxd-Gli3 antagonism. *Nature Comm.*, 7:12903
- Hui, C-C. et Joyner, A.L. (1993). A mouse model of Greig cephalo-polysyndactyly syndrome: the xtra-toes¹ mutation contains an intragenic deletion of the *Gli3* gene. *Nature Genetics*, 3, 241-246

Izpisua-Belmonte, J.-C. et Duboule, D. (1992). Homeobox genes and pattern formation in the vertebrate limb. *Developmental Biology*, 152, 26-36

Johnson, D.R. (1967). Extra-toes: a new mutant gene causing multiple abnormalities in the mouse. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 17(3), 543-581

Kawakami, Y., Capdevila, J., Buscher, D., Itoh, T., Rodriguez-Esteban, J. et Izpisua-Belmonte, C. (2001). WNT signals control FGF-dependent limb initiation and AER induction in the chick embryo. *Cell*, 104(6), 891-900

Kawakami, Y., Uchiyama, Y., Rodriguez-Esteban, C., Inenaga, T., Koyano-Nakagawa, N., Kawakami, H., Marti, M., Kmita, M., Monaghan-Nichols, P., Nishinakamura, R. et Izpisua-Belmonte, J.C. (2009). Sall genes regulate region-specific morphogenesis in the mouse limb by modulating Hox activities. *Development*, 136, 585-594

Keel, B.N. et Snelling, W.M. (2018). Comparison of Burrows-Wheeler transform-based mapping algorithms used in high-throughput whole-genome sequencing: Application to Illumina data for livestock genome. *Front. Genet.*, 9(35)

Kengaku, M., Capdevila, J., Rodriguez-Esteban, C., De La Pena, J., Johnson, R.L., Belmonte, J.C.I. et Tabin, C.J. (1998). Distinct WNT pathways regulating AER formation and dorsoventral polarity in the chick limb bud. *Science*, 289, 1274-1277

Kessel, M. et Gruss, P. (1991). Homeotic transformations of murine vertebrae and concomitant alteration of Hox codes induced by retinoic acid. *Cell*, 67, 89-104

Kherdjemil, Y., Lalonde, R.L., Sheth, R., Dumouchel, A., de Martino, G., Pineault, K.M., Wellik, D.M., Stadler, H.S., Akimenko, M.-A. et Kmita, M. (2016). Evolution of Hoxa11 regulation in vertebrates is linked to the pentadactyl state. *Nature*, 539, 89-92

Kherdjemil, Y. (2017). *Fonction et évolution de la régulation du gène Hoxa11 au cours du développement des membres chez les vertébrés*. Thèse de doctorat inédite. Université de Montréal.

Khokha, M.K., Hsu, D., Brunet, L.J., Dionne, M.S. et Harland, R.M. (2003). Gremlin is the BMP antagonist required for maintenance of Shh and Fgf signals during limb patterning. *Nature Genetics*, 34(3), 303-307

Kmita, M., Tarchini, B., Zakany, J., Logan, M., Tabin, C.J. et Duboule, D. (2005). Early developmental arrest of mammalian limbs lacking HoxA/HoxD gene function. *Nature*, 435, 1113-1116

Koshiba-Takeushi, K., Takeushi, J.K., Arruda, E.P., Kathiriya, I.S., Mo, R., Hui, C.-C., Srivastava, D. et Bruneau, B.G. (2006). Cooperative and antagonistic interactions between Sall4 and Tbx5 pattern the mouse limb and heart. *Nature Genetics*, 38, 175-183

- Kraus, P., Fraidenraich, D. et Loomis, C.A. (2001). Some distal limb structures develop in mice lacking Sonic hedgehog signaling. *Mech. Dev.*, 100, 45-58
- Krumlauf, R. (1992). Evolution of the vertebrate *Hox* homeobox genes. *BioEssays*, 14(4), 245-252
- Kuijper, S., Feitsma, H., Sheth, R., Korving, J., Reijnen, M. et Meijlink, F. (2005). Function and regulation of *Alx4* in limb development: Complex genetic interactions with *Gli3* and *Shh*. *Developmental Biology*, 285, 533-544
- Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M. et Salzberg, S.L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biology*, 10:R25
- Langmead, B. et Salzberg, S.L. (2012). Fast grapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 9, 357-359
- Lerdrup, M., Johansen, J.V., Agrawal-Singh, S. et Hansen, K. (2016). An interactive environment for agile analysis and visualization of ChIP-sequencing data. *Nature Structural & Molecular Biology*, 23, 349-357
- Lettice, L.A., Horikoshi, T., Heaney, S.J., van Baren, M.J., van der Linde, H.C., Breedveld, G.J., Joose, M., Akarsu, N., Oostra, B.A., Endo, N., Shibata, M., Suzuki, M., Takahashi, E., Shinka, T., Nakahori, Y., Ayusawa, D., Nakabayashi, K., Scherer, S.W., Heutink, P., Hill, R.E. et Noji, S. (2002). Disruption of a long-range cis-acting regulator for *Shh* causes preaxial polydactyly. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA*, 99, 7548-7553
- Lettice, L.A., Heaney, S.J., Purdie, L.A., Li, L., de Beer, P., Oostra, B.A., Goode, D., Elgar, G., Hill, R.E. et de Graaff, E. (2003). A long-range *Shh* enhancer regulates expression in the developing limb and fin and is associated with preaxial polydactyly. *Hum. Mol. Genet.*, 12(14), 1725-1735
- Lewandowski, M., Sun, X. et Martin, G.R. (2000). *Fgf8* signalling from the AER is essential for normal limb development. *Nature Genet.*, 26, 460-463
- Lewandoski, M. et Mackem, S. (2009). Limb development: The rise and fall of retinoic acid. *Current Biology*, 19(14), 558-561
- Lewis, E.B. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature*, 276, 565-570
- Li, D., Sakuma, R., Vakili, N.A., Puvindran, V., Deimling, S., Zhang, X., Hopyan, S. et Hui, C-C. (2014). Formation of proximal and anterior limb skeleton requires early function of *Irx3* and *Irx5* and is negatively regulated by *Shh* signaling. *Developmental Cell*, 29, 233-240

- Li, H. et Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, doi:10.1093/bioinformatics/btp324
- Li, Q., Lewandowski, J.P., Powell, M.B., Norrie, J.L., Cho, S.H. et Vokes, S.A. (2014a). A Gli silencer is required for robust repression of gremlin in the vertebrate limb bud. *Development*, 141, 1906-1914
- Li, Y., Zhang, H., Litingtung, Y. et Chiang, C. (2006). Cholesterol modification restricts the spread of Shh gradient in the limb bud. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103(17), 6548-6553
- Litingtung, Y., Dahn, R.D., Li, Y. et Fallon, J.F. (2002). Shh and Gli3 are dispensable for limb skeleton formation but regulate digit number and identity. *Nature*, 418, 979-983
- Logan, M., Martin, J., Nagy, A., Lobe, C., Olson, E.N. et Tabin, C. (2002). Expression of Cre recombinase in the developing mouse limb bud driven by a Prx1 enhancer. *Genesis*, 33, 77-80
- Lopez-Rios, J., Speziale, D., Robay, D., Scotti, M., Osterwalder, M., Nusspaumer, G., Galli, A., Holländer, G.A., Kmita, M. et Zeller, R. (2012). GLI3 constrains digit number by controlling both progenitor proliferation and BMP-dependent exit to chondrogenesis. *Developmental Cell*, 22(4), 8837-848
- Lopez-Rios, J., Duchesne, A., Speziale, D., Andrey, G., Peterson, K.A., Germann, P., Ünal, E., Liu, J., Floriot, S., Barbey, S., Gallard, Y., Müller-Gerbl, M., Courtney, A.D., Klopp, C., Rodriguez, S., Ivanek, R., Beisel, C., Wicking, C., Iber, D., Robert, B., McMahon, A.P., Duboule, D. et Zeller, R. (2014). Attenuated sensing of HH by Ptch1 underlies evolution of bovine limbs. *Nature*, 511, 46-51
- Lopez-Rios, J. (2016). The many lives of SHH in limb development and evolution. *Seminars in Cell & Development Biology*, 49, 116-124
- Lu, P. Minowada, G. et Martin, G.R. (2006). Increasing Fgf4 expression in the mouse limb bud causes polysyndactyly and rescues the skeletal defects that result from loss of Fgf8 function. *Development*, 133, 33-42
- Maas, S.A. et Fallon, J-F. (2005). Single base pair change in the long-range Sonic hedgehog limb-specific enhancer is a genetic basis for preaxial polydactyly. *Dev. Dyn.*, 232, 345-348
- Mariani, F.V., Ahn, C. et Martin, G.R. (2008). Genetic evidence that FGFs have an instructive role in limb proximal-distal patterning. *Nature*, 453, 401-405
- Martin, G.R. (1998). The roles of FGFs in the early development of vertebrate limbs. *Genes & Development*, 12, 1571-1586
- Masuya, H., Sagai, T., Wakana, S., Moriwaki, K. et Shiroishi, T. (1995). A duplicated zone of polarizing activity in polydactylous mouse mutants. *Genes Dev.*, 9, 1645-1653

Masuya, H., Sezutsu, H., Sakuraba, Y., Sagai, T., Hosoya, M., Kaneda, H., Miura, I., Kobayashi, K., Sumiyama, K., Shimizu, A., Nagano, J., Yokoyama, H., Kaneko, S., Sakurai, N., Okagaki, Y., Noda, T., Wakana, S., Gondo, Y. et Shiroishi, T. (2007). A series of ENU-induced single-base substitutions in a long-range *cis*-element altering Sonic hedgehog expression in the developing mouse limb bud. *Genomics*, 89(2), 207-214

McGinnis, W. et Krumlauf, R. (1992). Homeobox genes and axial patterning. *Cell*, 66, 283-302

Medina-Martinez, O., Bradley, A. et Ramirez-Solis, R. (2000). A large targeted deletion of Hoxb1-Hoxb9 produces a series single-segment anterior homeotic transformations. *Developmental Biology*, 222(1), 71-83

Mercader, N., Leonardo, E., Azpiazu, N., Serrano, A., Mrata, G., Martinez, C. Et Torres, M. (1999). Conserved regulation of proximodistal limb axis development by Meis1/Hth. *Nature*, 402, 425-429

Mercader, N., Leonardo, E., Piedra, M.E., Martinez, C., Ros, M.A. et Torres, M. (2000). Opposing RA and FGF signals control proximodistal vertebrate limb development through regulation of Meis genes. *Development*, 127, 3961-3970

Merino, R., Rodriguez-Leon, J., Macias, D., Ganan, Y., Economides, A.N. et Hurle, J.M. (1999). The BMP antagonist Gremlin regulates outgrowth, chondrogenesis and programmed cell death in the developing limb. *Development*, 126, 5515-5522

Mic, F.A., Ovidiu Sirbu, I. et Duester, G. (2004). Retinoic acid synthesis controlled by *Raldh2* is required early for limb bud initiation and then later as a proximodistal signal during apical ectodermal ridge formation. *The journal of Biological Chemistry*, 279(25), 26698-26706

McGlinn, E., Lammerts van Bueren, K., Fiorenza, S., Mo, R., Poh, A.M., Forrest, A., Soares, M.B., Bonaldo, M.F., Grimmond, S., Hui, C-C., Wainwright, B. et Wicking, C. (2005). Pax9 and Jagged1 act downstream of Gli3 in vertebrate limb development. *Mechanisms of Development*, 122, 1218-1233

Michos, O., Panman, L., Vintersten, K., Beier, K., Zeller, R. et Zuniga, A. (2004). Gremlin-mediated BMP antagonism induces the epithelial-mesenchymal feedback signaling controlling metanephric kidney and limb organogenesis. *Development*, 131, 3401-3410

Minguillon, C., Nishimoto, S., Wood, S., Vendrell, E., Gibson-Brown, J.J. et Logan, M.P.O. (2012). Hox genes regulate the onset of Tbx5 expression in the forelimb. *Development*, 139, 3180-3188

Minguillon, C., Del Buono, J. et Logan, M.P. (2005). Tbx5 and Tbx4 are not sufficient to determine limb-specific morphologies but have common roles in initiating limb outgrowth. *Developmental Cell*, 8, 75-84

Monkley, S.J., Delaney, S.J., Pennisi, D.J., Christiansen, J.H. et Wainwright, B.J. (1996). Targeted disruption of the Wnt2 gene results in placentation defects. *Development*, 122, 3343-3353

Montavon, T., Le Garrec, J-F., Kerszberg, M. et Duboule, D. (2008). Modeling Hox gene regulation in digit: reverse collinearity and the molecular origin of thumbness. *Genes & Development*, 22, 346-359

Moon, A.M. et Capecchi, M.R. (2000). Fgf8 is required for outgrowth and patterning of the limbs. *Nature Genet.*, 26, 455-459

Murone, M., Rosenthal, A. et de Sauvage, F.J. (1999). Hedgehog signal transduction: From flies to vertebrates. *Experimental Cell Research*, 253, 25-33

Nelson, C.E., Morgan, B.A., Burke, A.C., Laufer, E., DiMambro, E., Murtaugh, C.L., Tessarollo, L., Parada, L.F. et Tabin, C. (1996). Analysis of Hox gene expression in the chick limb bud. *Development*, 122, 1449-1466

Ng, J.K., Kawakami, Y., Buscher, D., Raya, A., Itoh, T., Koth, C.M., Rodriguez-Esteban, C., Rodriguez-Leon, J., Garrity, D.M., Fishman, M.C. et Izpisua-Belmonte, J.C. (2002). The limb identity gene Tbx5 promotes limb initiation by interacting with Wnt2b and Fgf10. *Development*, 129, 5161-5170

Niederreither, K., Subbaravan, V., Dollé, P. et Chambon, P. (1999). Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. *Nature Genetics*, 21, 444-448

Nishimoto, S., Wilde, S.M., Wood, S. et Logan, M.P.O. (2015). RA acts in a coherent feed-forward mechanism with Tbx5 to control limb bud induction and initiation. *Cell Reports*, 12, 879-891

Nissim, S., Hasso, S.M., Fallon, J.F. et Tabin, C.J. (2006). Regulation of Gremlin expression in the posterior limb bud. *Developmental Biology*, 299, 12-21

Niswander, L. et Martin, G.R. (1993). FGF-4 and BMP-2 have opposite effects on limb growth. *Nature*, 361, 68-71

Niswander, L., Tickle, C., Vogel, A., Booth, I. et Martin, G.R. (1993a). FGF-4 replaces the apical ectodermal ridge and directs outgrowth and patterning of the limb. *Cell*, 75, 579-587

Norrie, J.L., Lewandowski, J.P., Bouldin, C.M., Amarnath, S., Li, Q., Vokes, M.S., Ehrlich, L.I., Harfe, B.D. et Vokes, S.A. (2014). Dynamics of BMP signaling in limb bud mesenchyme and polydactyly. *Developmental Biology*, 393, 270-281

Nowicki, J.L. et Burke, A.C. (2000). Hox genes and morphological identity: axial versus lateral patterning in the vertebrate mesoderm. *Development*, 127, 4265-4275

- Ohuchi, H., Nakagawa, T., Yamamoto, A., Araga, A., Ohata, T., Ishimaru, Y., Yoshioka, H., Kuwana, T., Nohno, T., Yamasaki, M., Itoh, N. et Noji, S. (1997). The mesenchymal factor, FGF10, initiates and maintains the outgrowth of the chick limb bud through interaction with FGF8, an apical ectodermal factor. *Development*, 124, 2235-2244
- Panman, L., Drenth, T., te Welscher, P., Zuniga, A. et Zeller, R. (2005). Genetic interaction of Gli3 and Alx4 during limb development. *Int. J. Dev. Biol.*, 49, 443-448
- Pavel, E., Zhao, W., Powell, K.A., Weinstein, M. et Kirschne, L.S. (2007). Analysis of a new allele of *limb deformity (ld)* reveals tissue- and age-specific transcriptional effects of the Ld global control region. *Int. J. Dev. Biol.*, 51, 273-278
- Pearce, J.J., Penny, G. et Rossant, J. (1999). A mouse cerberus/DAN-related gene family. *Developmental Biology*, 209, 98-110
- Peters, H., Neubüser, A., Kratochwil, K. et Balling, R. (1998). Pax9-deficient mice lack pharyngeal pouch derivatives and teeth and exhibit craniofacial and limb abnormalities. *Genes & Development*, 12, 2735-2747
- Pineault, K.M. et Wellik, D.M. (2014). Hox genes and limb musculoskeletal development. *Curr. Osteoporos. Rep.*, 12(4), 420-427
- Pizette, S. et Niswander, L. (1999). BMPs negatively regulate structure and function of the limb apical ectodermal ridge. *Development*, 126, 883-894
- Qu, S., Niswender, K.D., Ji, Q., van der Meer, R., Keeney, D., Magnuson, M.A. et Wisdom, R. (1997). Polydactyly and ectopic ZPA formation in Alx-4 mutant mice. *Development*, 124, 3999-4008
- Qu, S., Tucker, S.C., Ehrlich, J.S., Levorse, J.M., Flaherty, L.A., Wisdom, R. et Vogt, T.F. (1998). Mutations in mouse *Aristaless-like4* cause Strong's luxoid polydactyly. *Development*, 125, 2711-2721
- Ramirez, F., Ryan, D.P., Grüning, B., Bhardwaj, V., Kilpert, F., Ritcher, A.S., Heyne, S., Dündar, F. et Manke, T. (2016). deepTools2: a next generation web server for deep-sequencing data analysis. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W160-W165
- Raspopovic, J., Marcon, L., Russo, L. et Sharpe, J. (2014). Digit patterning is controlled by a Bmp-Sox9-Wnt Turing network modulated by morphogen gradients. *Science*, 345(6196), 566-569
- Riddle, R.D., Johnson, R.L., Laufer, E. et Tabin, C. (1993). Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell*, 75, 1401-1416

Rodriguez-Esteban, C., Tsukui, T., Yonei, S., Magallon, J., Tamura, K. et Belmonte, J.C.I. (1999). The T-box genes *Tbx4* and *Tbx5* regulate limb outgrowth and identity. *Nature*, 398, 814-818

Sasaki, H., Nishizaki, Y., Nakafuku, M., Kondoh, H. (1999). Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling. *Development*, 126, 3915-3924

Saunders, J.W.Jr. (1948). The proximo-distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of the ectoderm. *Journal of Experimental Zoology*, 108(3), 363-403

Scherz, P.J., Harfe, B.D., McMahon, A.P. et Tabin, C.J. (2004). The limb bud Shh-Fgf feedback loop is terminated by expansion of former ZPA cells. *Science*, 305, 396-399

Scherz, P.J., McGlinn, E., Nissim, S. et Tabin, C.J. (2007). Extended exposure to Sonic hedgehog is required for patterning the posterior digits of the vertebrate limb. *Dev. Biol.*, 308, 343-354

Schimmang, T., Lemaistre, M., Vortkamp, A. et Rüther, U. (1992). Expression of the zinc finger gene Gli3 is affected in the morphogenetic mouse mutant extra-toes (Xt). *Development*, 116, 799-804

Sekine, K., Ohuchi, H., Fujiwara, M., Yamasaki, M., Yoshizawa, T., Sato, T., Yagishita, N., Matsui, D., Koga, Y., Itoh, N. et Kato, S. (1999). Fgf10 is essential for limb and lung formation. *Nature Genetics*, 21, 138-141

Sheth, R., Bastida, M.F. et Ros, M. (2007). Hoxd and Gli3 interactions modulate digit number in the amniote limb. *Developmental Biology*, 310, 430-441

Sheth, R., Marcon, L., Bastida, M.F., Junco, M., Quintana, L., Dahn, R., Kmita, M., Sharpe, J. et Ros, M.A. (2012). Hox genes regulate digit patterning by controlling the wavelength of a Turing-type mechanism. *Science*, 338, 1476-1480

Sheth, R., Grégoire, D., Dumouchel, A., Scotti, M., My Trang Pham, J., Nemec, S., Bastida, M.F., Ros, M.A. et Kmita, M. (2013). Decoupling the function of Hox and Shh in developing limb reveals multiple inputs of Hox genes on limb growth. *Development*, 140, 2130-2138

Sheth, R., Barozzi, I., Langlais, D., Osterwalder, M., Nemec, S., Carlson, H.L., Stadler, H.S., Visel, A., Drouin, J. et Kmita, M. (2016). Distal limb patterning requires modulation of cis-regulatory activities by HOX13. *Cell Reports*, 17, 2913-2926

Shubin, N., Tabin, C. et Carroll, S. (1997). Fossils, genes and the evolution of animal limbs. *Nature*, 388, 639-648

Shubin, N., Tabin, C. et Carroll, S. (2009). Deep homology and the origins of evolutionary novelty. *Nature*, 457, 818-823

- Small, K.M. et Potter, S.S. (1993). Homeotic transformations and limb defects in HoxA11 mutant mice. *Development*, 7, 2318-2328
- Stephens, T.D. et McNulty, T.R. (1981). Evidence for a metameric pattern in the development of the chick humerus. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 61, 191-205
- Stratford, T., Horton, C. et Maden, M. (1996). Retinoic acid is required for the initiation of outgrowth in the chick limb bud. *Current Biology*, 6(9), 1124-1133
- Suemori, H. et Noguchi, S. (2000). Hox C cluster genes are dispensable for overall body plan of mouse embryonic development. *Developmental Biology*, 220, 333-342
- Summerbell, D., Lewis, J.H. et Wolpert, L. (1973). Positional information in chick limb morphogenesis. *Nature*, 244, 492-496
- Sun, X. Mariani, F.V. et Martin, G.R. (2002). Functions of FGF signalling from the apical ectodermal ridge in limb development. *Nature*, 418, 501-508
- Suzuki, S., Ono, N., Furusawa, C., Ying, B-W. et Yomo, T. (2011). Comparison of sequence reads obtained from three next-generation sequencing platforms. *PloS One*, 6(5)
- Suzuki, T., Hasso, S.M. et Fallon, J.F. (2008). Unique SMAD1/5/8 activity at the phalanx-forming region determines digit identity. *PNAS*, 105(11), 4185-4190
- Tabin, C. et Wolpert, L. (2007). Rethinking the proximodistal axis of the vertebrate limb in the molecular era. *Genes Dev.*, 21, 1433-1442
- Tarchini, B., Duboule, D. et Kmita, M. (2006). Regulatory constraints in the evolution of the tetrapod limb anterior-posterior polarity. *Nature*, 443, 985-988
- Takahashi, M., Tamura, K., Büscher, D., Masuya, H., Yonei-Tamura, S., Matsumoto, K., Naitoh-Matsuo, M., Takeuchi, J., Ogura, K., Shiroishi, T., Ogura, T. et Izpisua-Belmonte, J.C. (1998). The role of Alx-4 in the establishment of anteroposterior polarity during vertebrate limb development. *Development*, 125, 4417-4425
- Takeuchi, J.K., Koshiba-Takeuchi, K., Matsumoto, K., Vogel-Höpker, A., Naitoh-Matsuo, M., Ogura, K., Takahashi, N., Yasuda, K. et Ogura, T. (1999). *Tbx5* and *Tbx4* genes determine the wing/leg identity of limb buds. *Nature*, 398, 810-814
- ten Berge, D., Koole, W., Fuerer, C., Fish, M., Eroglu, E. et Nusse, R. (2008). Wnt signaling mediates self-organization and axis formation in embryoid bodies. *Cell Stem Cell*, 3(5), 508-518
- Tickle, C. (2015). How the embryo makes a limb: determination, polarity and identity. *J. Anat.*, 227, 418-430

Tzchori, I., Day, T.F., Carolan, P.J., Zhao, Y., Wassif, C.A., Li, L., Lewandoski, M., Gorivodsky, M., Love, P.E., Porter, F.D., Westphal, H. et Yang, Y. (2009). LIM homeobox transcription factors integrate signaling events that control three-dimensional limb patterning and growth. *Development*, 136, 1375-1385

Veraksa, A., Del Campo, M. et McGinnis, W. (2000). Developmental patterning genes and their conserved functions: From model organisms to humans. *Mol. Gen. and Metab.*, 69, 85-100

Verheyden, J.M. et Sun, X. (2008). An Fgf/Gremlin inhibitory feedback loop triggers termination of limb bud outgrowth. *Nature*, 454, 638-642

Wang, B., Fallon, J.F. et Beachy, P.A. (2000). Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb. *Cell*, 100, 423-434

Welscher, P., Fernandez-Teran, M., Ros, M.A. et Zeller, R. (2002). Mutual genetic antagonism involving GLI3 and dHAND prepatterns the vertebrate limb bud mesenchyme prior to SHH signaling. *Genes & Development*, 16, 421-426

Wellik, D.M. et Capecchi, M.R. (2003). Hox10 and Hox11 genes are required to globally pattern the mammalian skeleton. *Science*, 301(5631), 363-367

Williamson, I., Lettice, L.A., Hill, R.E. et Bickmore, W.A. (2016). Shh and ZRS enhancer colocalisation is specific to the zone of polarizing activity. *Development*, 143, 2994-3001

Wolpert, L. (1969). Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation. *J. Theoret. Biol.*, 25, 1-47

Wolpert, L. (2002). The progress zone model for specifying positional information. *Int. J. Dev. Biol.*, 46, 869-870

Xu, B. et Wellik, D.M. (2011). Axial Hox9 activity establishes the posterior field in the developing forelimb. *PNAS*, 108(12), 4888-4891

Yang, Y., Drossopoulou, G., Chuang, P-T., Duprez, D., Marti, E., Bumcrot, D., Vargesson, N., Clarke, J., Niswander, L., McMahon, A. et Tickle, C. (1997). Relationship between dose, distance and time in Sonic Hedgehog-mediated regulation of anteroposterior polarity in the chick limb. *Development*, 124, 4393-4404

Yashiro, K., Zhao, X., Uehara, M., Yamashita, K., Nishijima, M., Nishino, J., Saijoh, Y., Sakai, Y. et Hamada, H. (2004). Regulation of retinoic acid distribution is required for proximodistal patterning and outgrowth of the developing mouse limb. *Developmental Cell*, 6(3), 411-422

Zakany, J., Zacchetti, G. et Duboule, D. (2007). Interactions between *HOXD* and *Gli3* genes control the limb apical ectodermal ridge via *Fgf10*. *Dev. Biol.*, 306(2), 883-893

Zakany, J. et Duboule, D. (2007a). The role of Hox genes during vertebrate limb development. *Curr. Opinion in Gen. & Dev.*, 17, 359-366

Zehentner, B.K., Haussmann, A. et Bartscher, H. (2002). The bone morphogenetic protein antagonist Noggin is regulated by Sox9 during endochondral differentiation. *Develop. Growth Differ.*, 44, 1-9

Zeller, R., Lopez-Rios, J. et Zuniga, A. (2009). Vertebrate limb bud development: moving towards integrative analysis of organogenesis. *Nature Reviews Genetics*, 10, 845-858

Zhang, Y., Liu, T., Meyer, C.A., Eickhoute, J., Johnson, D.S., Bernstein, B.E., Nusbaum, C., Myers, R.M., Brown, M., Li, W. et Liu, X. S. (2008). Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biology*, 9:R137

Zhou, F., Leder, P., Zuniga, A. et Dettenhofer, M. (2009). Formin1 disruption confers oligodactylism and alters Bmp signaling. *Human Molecular Genetics*, 18(13), 2472-2482

Zhulyn, O., Li, D., Deimling, S., Vakili, N.A., Mo, R., Puvion-Rodan, V., Chen, M-H., Chuang, P-T., Hopyan, S. et Hui, C-C. (2014). A switch from low to high Shh activity regulates establishment of limb progenitors and signaling centers. *Developmental Cell*, 29(2), 241-249

Zuniga, A., Haramis, A-P.G., McMahon, A.P. et Zeller, R. (1999). Signal relay by BMP antagonism controls the SHH/FGF4 feedback loop in vertebrate limb buds. *Nature*, 401, 598-602

Zuniga, A. et Zeller, R. (1999a). Gli3 (Xt) and formin (ld) participate in the positioning of the polarising region and control of posterior limb-bud identity. *Development*, 126, 13-21

Zuniga, A., Michos, O., Spitz, F., Haramis, A-P.G., Panman, L., Galli, A., Vintersten, K., Klasen, C., Mansfield, W., Kuc, S., Duboule, D., Dono, R. et Zeller, R. (2004). Mouse limb deformity mutations disrupt a global control region within the large regulatory landscape required for Gremlin expression. *Genes & Dev.*, 18, 1553-1564

Zuniga, A., Laurent, F., Lopez-Rios, J., Klasen, C., Matt, N. et Zeller, R. (2012). Conserved cis-regulatory regions in a large genomic landscape control SHH and BMP-regulated Gremlin1 expression in mouse limb buds. *BMC Developmental Biology*, 12-23

Zuniga, A. (2015). Next generation limb development and evolution: old questions, new perspectives. *Development*, 142, 3810-3820